

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie und Endokrinologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. T. Gress

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Charakterisierung eines transgenen Mausmodells zur
Kooperation zwischen NFATc1 und Kras^{G12D} in der
Pankreaskarzinogenese**

Philipps



Universität
Marburg

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Julius Nikorowitsch
aus Schwerin

Marburg, 2016

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der Philipps-
Universität Marburg <http://archiv.ub.uni-marburg.de>

Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
22.01.2016.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. V. Ellenrieder

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. T. Stiewe

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	VI
SUMMARY	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 DAS DUKTALE ADENOKARZINOM DES PANKREAS	1
1.2 ZELL- UND MOLEKULARBIOLOGISCHE GRUNDLAGEN	3
1.2.1 DAS PROGRESSIONSMODELL	3
1.2.2 DIE ROLLE DES ONKOGENS KRAS	7
1.2.3 DER Ca^{2+} /CALCINEURIN/NFAT-SIGNALWEG	11
1.2.4 DIE BEDEUTUNG VON NFATc1 IN DER PANKREASKARZINOGENESE	14
1.3 ZIEL DER ARBEIT	17
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 LABORGERÄTE	19
2.2 MATERIALIEN	20
2.3 CHEMIKALIEN	21
2.4 TRANSGENE MAUSLINIEN	23
2.5 HALTUNG UND ZUCHT DER MÄUSE	26
2.6 GENOTYPISIERUNG DER MÄUSE AUF <i>NFATc1</i> , <i>KRAS^{G12D}</i> UND <i>CRE</i>	26
2.6.1 DNA-EXTRAKTION AUS EINER MAUSSCHWANZBIOPSIE	26
2.6.2 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	27
2.6.3 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG IM AGAROSEGEL	30
2.6.4 AUSWERTUNG DER PCR	31
2.7 TÖTUNG DER MÄUSE UND ENTNAHME DER ORGANE	32
2.8 AUFARBEITUNG DES GEWEBES FÜR DIE HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	32
2.8.1 HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG (H.E. -FÄRBUNG)	32
2.8.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG	33
2.9 PROTEINANALYSE DES ENTNOMMENEN PANKREASGEWEBES	36
2.9.1 PROTEINISOLIERUNG	36
2.9.2 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	37
2.9.3 SODIUMDODECYLSULFAT POLYACRYLDAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	38

2.9.4	WESTERN BLOT	41
3	ERGEBNISSE	45
3.1	GENOTYPISIERUNG DER ZUCHTLINIEN	45
3.2	<i>C.N.NFATc1</i> AKZELERIERT DIE <i>KRAS^{G12D}</i>-ABHÄNGIGE PANKREASKARZINOGENESE	47
3.2.1	MAKROSKOPISCHE ANALYSEN	47
3.2.2	DIE <i>C.N.NFATc1</i> / <i>KRAS^{G12D}</i> -ABHÄNGIGE KARZINOGENESE DURCHLÄUFT DIE SCHRITTE DES PROGRESSIONSMODELLS	52
3.2.3	PROLIFERATIONSINDEX, GRADING UND EXPRESSION DER CYCLOOXYGENASE-2 ZEIGEN EINE HOHE MALIGNITÄT DES PDAC DER <i>C.N.NFATc1</i> ; <i>KRAS^{G12D}</i> -MÄUSE	56
3.3	AZINÄR-DUKTALE METAPLASIEN ALS AUSGANGSPUNKT DER KARZINOGENESE	61
3.3.1	<i>C.N.NFATc1</i> WIRD WÄHREND DER GESAMTEN KARZINOGENESE EXPRIMIERT	61
3.3.2	DIE PANIN-ZELLEN ZEIGEN AZINÄRE EIGENSCHAFTEN	63
3.4	MODULATION ONKOGENER SIGNALWEGE	65
3.4.1	FRÜHE AKTIVIERUNG DES NOTCH-SIGNALWEGES UND INAKTIVIERUNG VON p16 ^{INK4A}	65
4	DISKUSSION	69
4.1	NFATc1 AKZELERIERT DIE KRAS-INDUZIERT E PANKREASKARZINOGENESE	69
4.1.1	<i>C.N.NFATc1</i> ; <i>KRAS^{G12D}</i> - MÄUSE ENTWICKELN TUMOREN DURCH AZINÄR-DUKTALE TRANSDIFFERENZIERUNG	71
4.1.2	COEXPRESSION VON <i>C.N.NFATc1</i> UND <i>KRAS^{G12D}</i> RESULTIERT IN EINER GESTEIGERTEN MALIGNITÄT	72
4.2	DIE ROLLE VON NFATc1 BEI DER ÜBERWINDUNG DER KRAS-INDUZIERTEN SENESZENZ	73
4.3	NFAT -INHIBITOREN IN DER THERAPIE DES PDAC	75
4.4	SCHLUSSFOLGERUNG	76
5	LITERATURVERZEICHNIS	78
6	ANHANG	89
6.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	89
6.2	TABELLENVERZEICHNIS	91
6.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	92
6.4	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	95
6.5	DANKSAGUNG	96

Zusammenfassung

Der *Nuclear Factor of Activated T-Cells* (NFAT) c1 ist ein onkogener Transkriptionsfaktor, der im humanen Pankreaskarzinom überexprimiert wird. In Kooperation mit unterschiedlichen Partnerproteinen beeinflusst NFATc1 die Expression von Genen der Zellzyklus-Regulation und fördert so das Tumorwachstum. Im transgenen Mausmodell konnte zwar eine wachstumsregulierende Funktion von NFATc1 bestätigt werden, allerdings führte die Pankreas-spezifische Expression von konstitutiv nukleärem NFATc1 (*c.n.NFATc1*) weder zur Ausbildung prämaligener PanIN-Läsionen noch zur Entwicklung invasiver Karzinome. Als entscheidender Faktor für die Initiation der Pankreaskarzinogenese gilt eine aktivierende Mutation des Proto-Onkogens Kras, die in mehr als 90% der humanen Pankreaskarzinome vorliegt und dessen Expression in transgenen Mausmodellen zur Ausbildung von Vorläuferläsionen führt. Eine alleinige Mutation von Kras führt allerdings nur sporadisch zur Entwicklung invasiver Pankreaskarzinome. Daher wurde postuliert, dass für die weitere Progression zum invasiven Karzinom weitere genetische oder epigenetische Ereignisse essentiell sind. Ziel dieser Arbeit war es, die potentielle onkogene Kooperation von NFATc1 und Kras^{G12D} *in vivo* zu überprüfen, zu charakterisieren und die zugrunde liegenden Mechanismen zu entschlüsseln. Dazu wurde eine im humanen Pankreaskarzinom häufig vorkommende Situation (ca.70%) – eine NFATc1-Überexpression und Kras-Mutation - im Mausmodell genetisch induziert. Es zeigte sich, dass die gemeinsame Aktivierung beider Onkogene (*c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48/PDX1-Cre*) in einer massiven Akzeleration der Karzinogenese mit Entstehung duktaler Adenokarzinome des Pankreas mündet. Auf histologischer Ebene rekapitulieren die Karzinome die humane Pankreaskarzinogenese mit Ausbildung früher azinär-duktalear Metaplasien, benigner Zwischenstadien (PanIN1-3 Läsionen) und der Entwicklung duktalear Adenokarzinome. In Analogie zur humanen Karzinogenese zeigten die Tumore eine hohe Proliferationsrate und eine Aktivierung zentraler onkogener Signalwege wie z.B. dem Notch-Signalweg. Hierbei scheint die NFATc1-

abhängige Überwindung der Kras^{G12D}-induzierten Seneszenz durch Inaktivierung des Tumorsuppressors p16^{INK4A} eine Progression der Karzinogenese zu begünstigen. Zusammenfassend konnte eine onkogene Kooperation zwischen Kras und NFATc1 in der Karzinogenese des Pankreas aufgezeigt werden. Eine gezielte Intervention des NFATc1 Signalweges könnte ein neue Strategie in der Behandlung des Pankreaskarzinoms darstellen.

Summary

The ***Nuclear Factor of Activated T-Cells*** (NFAT) c1 is an oncogenic transcription factor, which is frequently overexpressed in pancreatic cancer. NFATc1 controls the expression of critical cell-cycle regulators in cooperation with different partner proteins, thereby enhancing tumor growth. The pro-proliferative function of NFATc1 has been shown in a previous transgenic mouse model. However, the expression of constitutive active NFATc1 (*c.n.NFATc1*) in the pancreas neither stimulated the formation of PanIN lesions typical for human pancreatic cancer nor caused development of invasive carcinomas. The mutation of the proto-oncogene Kras is found in the vast majority of pancreatic cancers, where it is considered the initiating event. In genetically modified mice, Kras induces formation of precursor lesions but promotes cancer development with only low frequency. Therefore, additional genetic or epigenetic events are required for the progression to invasive cancer.

The aim of this thesis was to investigate and characterize the oncogenic cooperation between NFATc1 and Kras^{G12D} *in vivo* and to explore the underlying mechanisms. To this end, both oncogenes were co-expressed in the exocrine pancreas of transgenic mice.

Here, we demonstrate that combined expression of *c.n.NFATc1* and *Kras*^{G12D} in pancreata of mice (*c.n.NFATc1;Kras*^{G12D};*P48/PDX1-Cre*) leads to massive acceleration of pancreatic carcinogenesis, causing formation of acinar-ductal metaplasia, PanIN1-3 lesions, and the development of invasive pancreatic cancer. In analogy to human pancreatic carcinogenesis, combined expression of

both oncogenes resulted in marked cell proliferation and activation of oncogenic pathways such as the Notch- signaling pathway. Disruption of Kras-induced and p16^{INK4A}-dependent senescence appears to contribute to cancer progression.

In conclusion, a massive acceleration of Kras-induced carcinogenesis due to oncogenic cooperation with NFATc1 could be depicted. Thus, the great importance of the Ca²⁺/Calcineurin/NFATc1-signaling pathway as a target for therapy of pancreatic cancer was underlined.

1 Einleitung

1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Das Pankreaskarzinom stellt die vierthäufigste durch Krebs hervorgerufene Todesursache in der westlichen Welt dar (Husmann et al., 2010). Damit ist es für jährlich ca. 13.400 Todesfälle bei ca. 14.000 Neuerkrankungen in Deutschland verantwortlich. Die Schwere der Erkrankung und der Mangel an zielgerichteten suffizienten Therapiemethoden drückt sich auch in einer 5-Jahresüberlebensrate von 5-7 % bei Männern und 3-8 % bei Frauen in Deutschland aus (Husmann et al., 2010).

Mehr als 90% der Pankreaskarzinome gehen von den exokrinen Organanteilen aus und zeigen einen duktales Phänotyp. Diese Adenokarzinome finden sich zu ca. 70% im Pankreaskopf (Bohmig und Rosewicz, 2004). Weitere Tumorentitäten im Pankreas umfassen Zystadenokarzinome, Azinuszellkarzinome und adenosquamoses Karzinome (Seufferlein und Adler, 2009).

Zu den Risikofaktoren des duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC) zählen der Nikotinabusus, eine positive Familienanamnese, erhöhtes Alter, männliches Geschlecht, Diabetes mellitus und Adipositas (Vincent et al., 2011). Die chronische Pankreatitis stellt jedoch den wichtigsten bekannten Risikofaktor für die Entstehung eines PDAC dar (Dite et al., 2012; Lowenfels et al., 1993; Malka et al., 2002).

Symptome eines exokrinen Pankreaskarzinoms umfassen einen dumpfen, in den Rücken ausstrahlenden Oberbauchschmerz, einen obstruktiven Ikterus und Gewichtsabnahme. Diese entsteht durch Anorexie, Maldigestion oder Kachexie. In 25% der Fälle kann auch ein Diabetes mellitus beobachtet werden (Seufferlein und Adler, 2009).

Die hohe Letalität kann dadurch erklärt werden, dass die Tumorentstehung und Progression aufgrund der geringen oder unspezifischen Symptome meist unentdeckt verläuft und daher die Diagnose häufig erst in einem fortgeschrittenen und metastasierten Stadium gestellt werden kann (Seufferlein

und Adler, 2009). Leber, Peritoneum, Lunge und selten auch Knochen sind die bevorzugten Lokalisationen von Fernmetastasen (Fernandez-del Castillo, 01/2011). Des Weiteren besteht bis heute keine suffiziente Screeningmethode (Seufferlein und Adler, 2009).

Die bisher einzige kurative Therapieoption besteht in der Tumorresektion. Aufgrund des meist fortgeschrittenen Stadiums zum Zeitpunkt der Diagnosestellung kommen jedoch nur ca. 20 % der Patienten für eine Resektion des Karzinomgewebes in Frage (Ottenhof et al., 2011).

Nach erfolgreicher Resektion (R0/R1) kann durch eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabine oder 5-FU für 6 Monate die Rezidivrate gesenkt und das Überleben signifikant verbessert werden (S3 Leitlinie, Seufferlein et al., 2009).

In der palliativen Situation hat sich das Spektrum der medikamentösen Möglichkeiten in den letzten Jahren erheblich verbessert. Neben Gemcitabin, welches hier nur einen geringen Vorteil bringt, lassen sich durch neue Kombinations-Regime, z.B. FOLFIRINOX und Gemcitabine plus Nab-Paclitaxel deutliche Überlebensvorteile erzielen (Goldstein et al., 2015; Vaccaro et al., 2011). Des Weiteren steht in der palliativen Therapie zusätzlich eine Kombination von Gemcitabine mit Erlotinib, einem Inhibitor der epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)- Rezeptor-Tyrosinkinase, zur Verfügung (Moore et al., 2007). Die Kombination mit Erlotinib zeigt jedoch nur bei der Patientensubgruppe, die eine deutliche Hautreaktion entwickeln, signifikante Überlebensvorteile gegenüber einer Gemcitabin-Monotherapie (Seufferlein und Adler, 2009). Insgesamt bleiben die Therapieoptionen beim Pankreaskarzinom limitiert. Daher bedarf es weiterer Forschungsanstrengungen, um durch die Entschlüsselung zentraler molekularer Mechanismen der Pankreaskarzinogenese neue Therapieansätze entwickeln zu können.

1.2 Zell- und Molekularbiologische Grundlagen

1.2.1 Das Progressionsmodell

Ein duktales Adenokarzinom des Pankreas entsteht nach dem derzeit anerkannten Progressionsmodell durch schrittweise Progression über präneoplastische Vorstufen (Hruban et al., 2000; Morris et al., 2010). Diese histologisch als Läsionen sichtbaren Vorstufen können in pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN), intraduktale papilläre muzinöse Neoplasmen (IPMN) und muzinös zystische Neoplasmen (MCN) unterteilt werden. IPMNs und MCNs sind Vorstufen für zystische Pankreastumore, welche für ca. 5 % der primären Pankreastumore verantwortlich sind (Haugk, 2010). Die häufigsten beim Menschen gefundenen präneoplastischen Vorstufen stellen die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien dar (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2) (Haugk, 2010). Normale Pankreasgänge zeichnen sich histologisch durch ein kubisches bis hochprismatisches Epithel mit amphophilem Zytoplasma aus und weisen weder muzinöses Zytoplasma, noch nukleäre Verdrängungen oder nukleäre Atypien auf (siehe Abbildung 1 oben links). PanIN-Läsionen, welche per Definition nur in kleinen Gängen zu finden sind, werden nach Dysplasiegrad in vier Grade eingeteilt und weisen zunehmende zelluläre und architektonische Atypien auf, wobei PanIN1A bis 1B die niedrigsten Dysplasiestufen und PanIN3-Läsionen, auch als Carcinoma *in situ* bezeichnet, die höchste Dysplasiestufe darstellen (siehe Abbildung 1). Gegenüber einem invasiven Karzinom unterscheidet sich die PanIN3 Läsion dadurch, dass die Basalmembran nicht durchbrochen ist (Hruban et al., 2004).

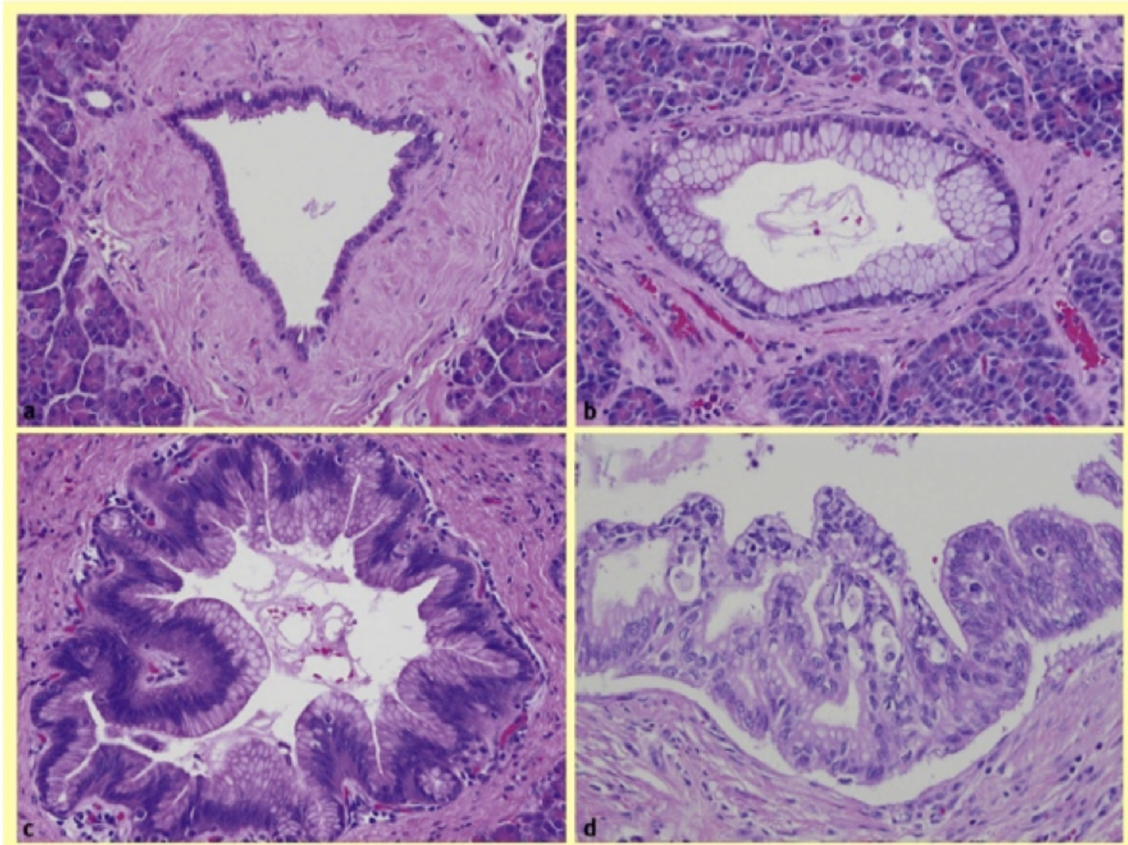


Abbildung 1: PanIN-Läsionen in Gewebeschnitten humaner Pankreata (de Wilde et al., 2012)

H.E. gefärbte Gewebeschnitte humaner Pankreata weisen einen normalen Gang (a), eine PanIN1A-Läsion (b) mit apikalem Mucus, eine PanIN2-Läsion (c), welche etwas vergrößerte Kerne aufweist und eine mit nukleären Pleomorphismen versehene PanIN3-Läsion (d) auf.

In histologischen Untersuchungen von humanen Pankreata, die aufgrund eines Adenokarzinoms reseziert wurden, konnten in 82% PanIN-Läsionen nachgewiesen werden, während nur 28% der gesunden Pankreata PanINs aufwiesen. Außerdem konnte eine progressive Zunahme der höhergradigen PanIN-Läsionen in Pankreata mit Adenokarzinomen gegenüber benignen Pankreata festgestellt werden (Andea et al., 2003).

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass eine initiale Aktivierung des Onkogens Kras vorliegen muss, um die Entstehung von Vorläuferläsionen zu fördern, während für die weitere Progression zusätzliche genetische oder epigenetische Veränderungen bzw. die Aktivierung onkogener Signalwege oder Inaktivierung

tumorsuppressiver Signalwege notwendig sind (De La O et al., 2008; Guerra et al., 2011; Hruban et al., 2004; Morris et al., 2010; Perez-Mancera et al., 2012). Histologische Untersuchungen humaner PDAC fanden dabei Kras-Mutationen in mehr als 90% aller humanen Pankreaskarzinome (Collins et al., 2012; Hruban et al., 2008; Koorstra et al., 2008). So konnte in zahlreichen transgenen Mausmodellen, die Kras in seiner konstitutiv aktiven Form im Pankreas exprimierten, die Entstehung eines humanen PDAC über die sogenannte PanIN-PDAC-Linie rekapituliert werden (siehe Abbildung 2) (Morris et al., 2010).

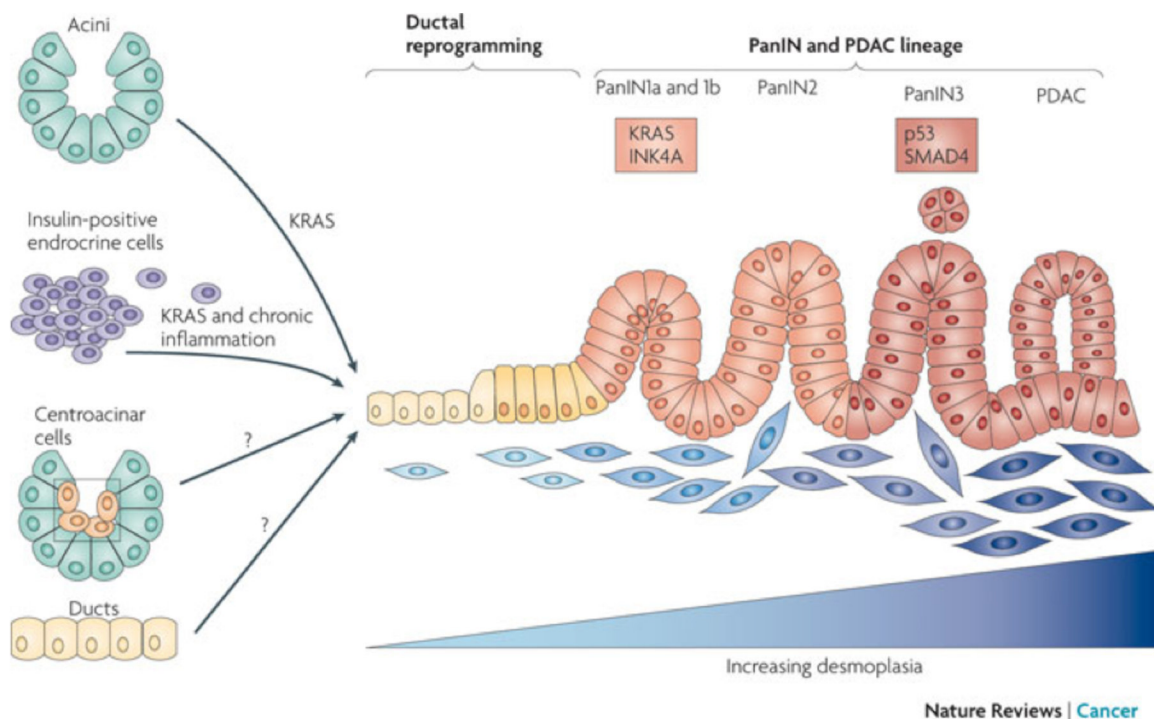


Abbildung 2: Initiation und Progression des PDAC (Morris et al., 2010)

Die Expression von konstitutiv aktivem Kras initiiert die PanIN-Bildung und legt damit einen Grundstein für die PDAC-Formation. PanINs werden nach zunehmenden Atypien in drei Grade unterteilt und weisen beim Menschen häufig die in den Boxen genannten zunehmenden Mutationen und eine verstärkte desmoplastische Reaktion auf. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass durch aktivierende Kras-Mutationen sowohl aus Azini als auch aus Insulin-positiven Zellen, über eine Reprogrammierung zu dukталen Zellen, PanINs und im weiteren Verlauf PDAC entstehen können. Diese sogenannte PanIN-PDAC-Linie konnte bisher jedoch weder für duktale noch für zentroazinäre Zellen nachgewiesen werden, ist aber auch für diese Zellen nicht auszuschließen.

Als Vorstufen für die PanIN-Bildung durch duktale Reprogrammierung werden Azinuszellen, Inselzellen, zentroazinäre Zellen und duktale Zellen diskutiert, welche durch eine Aktivierung des Onkogens Kras und embryonaler Signalwege in der Induktion der Karzinogenese resultieren (Morris et al., 2010). Beobachtungen in transgenen Mausmodellen, welche mutiertes Kras exprimierten, konnten die duktale Reprogrammierung und anschließende PanIN-Bildung aus azinären und aus Insulin-positiven Inselzellen bestätigen. Als erster Schritt in der Karzinogenese gilt derzeit eine azinär-duktales Metaplasie (ADM), d.h. eine Transdifferenzierung azinärer Zellen in einen duktales Phänotyp (Shi et al., 2009; Shi et al., 2013; Zhu et al., 2007). Sowohl in humanen als auch in murinen Pankreata transgener Mausmodelle wurde während der Pankreaskarzinogenese eine positive Korrelation von PanINs und ADMs beobachtet (Brune et al., 2006; Detlefsen et al., 2005; Shi et al., 2009).

Über die Kras-Mutation hinaus können sowohl in den benannten Vorläuferläsionen als auch im PDAC zahlreiche genetische und epigenetische Veränderungen nachgewiesen werden. Diese führen häufig zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder zur Aktivierung onkogener Signalwege. Zu den wichtigsten im Adenokarzinom inaktivierten Tumorsuppressorgenen gehören mit einer Inzidenz von 80 – 95 % p16^{INK4A}, mit 50 – 75 % p53, mit 30 – 60 % p21 und mit ca. 50 % DPC4 (Smad4) (Koorstra et al., 2008). Die initiale Mutation des Onkogens Kras in mehr als 90% der Fälle zählt, wie bereits erwähnt, zu den häufigsten Alterationen. Außerdem konnte in 69,5% der humanen PDAC eine Überexpression des Transkriptionsfaktors NFATc1 nachgewiesen werden (Buchholz et al., 2006). Auch die embryonalen Signalwege Notch, Wnt und die Mammilian Hedgehog Familie spielen eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des PDAC (Koorstra et al., 2008; Morris et al., 2010). Die Anzahl der genetischen und epigenetischen Veränderungen nimmt mit steigender Dysplasie der Vorläuferläsionen bis zum PDAC zu. So treten Kras-Mutationen und p16^{INK4A} Inaktivierungen häufig schon in PanIN1 Läsionen auf, während eine Inaktivierung von p53 und Smad4 meist erst in PanIN3 Läsionen beobachtet werden (Morris et al., 2010).

Insgesamt unterstützen diese Befunde das Progressionsmodell der Pankreas-Karzinogenese: das progressive Auftreten genetischer und epigenetischer Veränderungen geht mit der Progression von präinvasiven Vorstufen bis hin zur Entwicklung eines PDAC einher (Abbildung 2).

1.2.2 Die Rolle des Onkogens Kras

Kras-Proteine regulieren essentielle zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose (Kranenburg, 2005). Mutationen im Kras-Gen können jedoch über eine übermäßige Aktivierung nachgeschalteter Signalwege zu überschießender Proliferation und verlängertem Überleben der Zellen führen und somit die Karzinogenese zumindest begünstigen (Russo et al., 2009). Solche Aberrationen können in 16-38 % aller nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome, in 30-40 % aller kolorektaler Karzinome, in 45 % aller intrahepatischer Cholangiokarzinome und in mehr als 90 % aller Pankreaskarzinome nachgewiesen werden (Russo et al., 2009). Für die Karzinogenese relevante Mutationen im Kras-Gen treten hauptsächlich an V12 oder G12 auf und resultieren durch einen Verlust der intrinsischen Guanosintriphosphat (GTP)-Hydrolyse-Aktivität in einer konstitutiven Aktivierung des Kras-Proteins. Eine solche Mutation findet sich bereits in 20% aller PanIN1 Dysplasien und gilt damit als eine der ersten in der Genese des Pankreaskarzinoms auftretenden genetischen Alterationen (Ottenhof et al., 2011).

Kras ist ein monomeres, an die Membran gebundenes Guanin-Nukleotid (GDP/GTP)-Bindungs-Protein. Es wird über die Bindung von GTP mit Hilfe von Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) aktiviert und über dessen Hydrolyse, die durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) gefördert wird, zu Kras-GDP inaktiviert. Extrazelluläre Stimuli, wie z.B. der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), führen über eine Tyrosin-Autophosphorylierung des intrazellulären Rezeptoranteils zu einer Bindung von Proteinen mit einer Src-Homologie-2(SH2)-Domäne. Grb2, ein Protein mit SH2 Domäne, liegt im Zytoplasma im Komplex mit dem Protein „*Son of Sevenless*“ (Sos) vor. Durch die Bindung von Grb2 an die phosphorylierten Domänen des Rezeptors wird der

GEF Sos aus dem Komplex gelöst und aktiviert Kras über den Austausch von GDP mit GTP (Russo et al., 2009).

Kras-GTP rekrutiert und phosphoryliert das Protein Raf an der Zellmembran, welches über seine Serin-Threonin-Kinase „*Mitogen activated Protein Kinase Kinase 1/2*“ (MEK1/MEK2) phosphoryliert. MEK1/2 aktivieren über ihre Kinase-Eigenschaft „*Extracellular regulated kinases 1/2*“ (ERK1/2), welche in den Kern translozieren und dort die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren regulieren, welche die Expression vieler für Zellproliferation und -überleben wichtiger Gene bewirken (Russo et al., 2009).

In Pankreaszelllinien führt konstitutiv aktives Kras zu einer erhöhten Wachstumsrate, Verankerungs-unabhängigem Wachstum und Invasion (Campbell et al., 2007). Darüberhinaus wurde ein Angiogenese-fördernder Einfluss des Kras-Signalweges beschrieben (Matsuo et al., 2009). Auch die Reprogrammierung von Azinuszellen zu PanIN-Vorläuferzellen konnte durch mutiertes Kras erreicht werden, sodass damit ein entscheidender Einfluss von Kras auf die Initiierung der Pankreaskarzinogenese postuliert werden kann (Shi et al., 2013).

In transgenen Mausmodellen konnte die Relevanz des Onkogens Kras für die Karzinogenese des Pankreas *in vivo* aufgezeigt werden. So generierten Hingorani et al. (2003) ein transgenes Mausmodell mit einer Pankreas-spezifischen Expression des mutierten Kras-Proteins. Die Kras^{G12D}-Mutation wird dabei häufig im humanen Pankreaskarzinom beobachtet und sieht einen Austausch von Guanin durch Adenosin in Exon 1 in Codon 12 vor. Dies führt über einen Verlust der intrinsischen und der extrinsischen GTPase Aktivität zu einer konstitutiven Aktivierung des Kras-Proteins (Rachagani et al., 2011). Bei diesen Mäusen konnten ab einem Alter von zwei Wochen die ersten PanIN1A-Läsionen nachgewiesen werden. Ab einem Alter von sieben bis zehn Monaten wurden mehr neoplastische als gesunde Ductus in den Pankreata gezählt, wobei auch hochgradige PanIN3-Dysplasien gefunden wurden. Des Weiteren wurde azinäres Gewebe durch eine desmoplastische Reaktion ersetzt und die Proliferationsrate war erhöht. Dazu konnte in den Gewebeabschnitten der

transgenen Mäuse Zytokeratin-19 (CK-19), ein aktiver Notch-Signalweg (Hes1 positiv) sowie eine vermehrte Synthese des COX-2-Gens als Hinweis auf einen inflammatorischen Vorgang im Zytosol nachgewiesen werden. Schließlich konnten die Autoren eine starke Ähnlichkeit der murinen PanINs mit den humanen aufzeigen.

Die Progression über das PanIN-Stadium hinaus zum metastasierten, duktalem Adenokarzinom des Pankreas konnte allerdings nur in zwei von 29 Mäusen gefunden werden (Hingorani et al., 2003). Aufgrund dieses geringen Anteils an PDAC-bildenden Mäusen und durch eigene Beobachtungen gestützt, postulierten unter anderem Guerra et al. und Morris et al. dass die Mutation des Kras Onkogens alleine nicht ausreicht, um die Progression zum Karzinom über das PanIN-Stadium hinaus zu stimulieren (Guerra et al., 2007; Morris et al., 2010). Weiterführende Studien bestätigten, dass es vielmehr weiterer genetischer oder epigenetischer Inaktivierungen tumorsuppressiver Proteine, bzw. einer onkogenen Kooperation mit weiteren deregulierten Signalwegen bedarf (Guerra et al., 2007). So bekräftigten Hingorani et al. diese Beobachtungen, indem sie die Pankreas-spezifische Expression von Kras^{G12D} mit einer Pankreas-spezifischen Expression des mutierten Tumorsuppressorgens p53 (*Trp53*^{R172H}) kombinierten und eine stark beschleunigte Karzinogenese verglichen mit Kras^{G12D}-Kontrollmäusen detektierten. Die Mäuse entwickelten alle Stufen der beim Menschen bekannten PanIN-Läsionen und wiesen aufgrund der frühen Entwicklung duktaler Adenokarzinome ein stark verkürztes medianes Überleben von fünf Monaten auf. Von 28 beobachteten Mäusen erlagen alle dem Pankreaskarzinom spätestens nach einer Lebensdauer von einem Jahr (Hingorani et al., 2005). Auch die Inaktivierung weiterer tumorsuppressiver Gene in Kombination mit mutiertem Kras führte im Mausmodell über das PanIN-Stadium hinaus zur Entwicklung eines PDAC (siehe Abbildung 3). Hierzu zählen unter anderem die Inaktivierung von p16^{INK4A}, Retinoblastoma (Rb) 1 und des „transforming growth factor β “ (TGF- β) Rezeptors 2 (Bardeesy et al., 2006a; Bardeesy et al., 2006b; Carriere et al., 2011; Ijichi et al., 2006). Insgesamt konnte anhand zahlreicher transgener Mausmodelle festgestellt werden, dass sowohl

der Phänotyp als auch die Prognose des Tumors stark von den vorliegenden genetischen Alterationen abhängig sind. So führte die Inaktivierung von Smad4 vor dem Hintergrund einer $Kras^{G12D}$ -Mutation zur Entstehung von intraduktalen papillären muzinösen Neoplasien (IPMN), welche als Vorstufen für die Formation eines zystischen PDAC angesehen werden (Bardeesy et al., 2006b). Die Prognose der Mäuse, die neben mutiertem Kras eine inaktivierende Mutation des TGF- β -Rezeptor-2-Gens aufwiesen, war mit einem medianen Überleben von 52 Tagen gegenüber Mäusen mit einer zusätzlichen Mutation des p53-Gens von fünf Monaten signifikant schlechter (Hingorani et al., 2005; Ijichi et al., 2006). Nicht zuletzt geht die Induktion einer Pankreatitis, welche zu den Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung des PDACs zählt, im $Kras^{G12D}$ transgenen Mausmodell mit einer deutlichen Akzeleration der Karzinogenese und Entwicklung eines metastasiertem PDAC einher (Guerra et al., 2007).

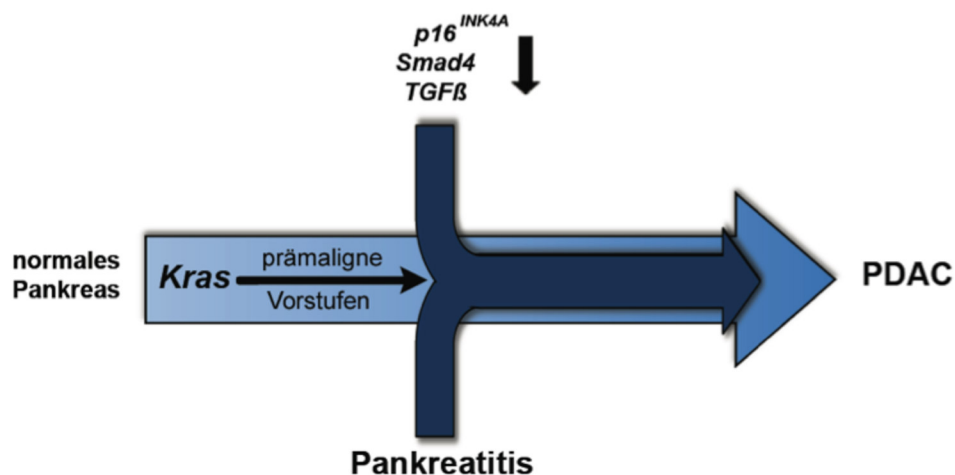


Abbildung 3: Schematische Darstellung der PDAC-Entwicklung.

Durch Inaktivierung der dargestellten Tumorsuppressoren oder durch eine Pankreatitis entwickelt sich bei vorbestehender Kras-Mutation ein PDAC in transgenen Mäusen (Bardeesy et al., 2006a; Bardeesy et al., 2006b; Guerra et al., 2007; Ijichi et al., 2006).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch eine Mutation von Kras im Pankreas die ersten Schritte der humanen Karzinogenese im transgenen Mausmodell zuverlässig histologisch nachempfunden werden können, die Ausbildung eines fulminanten duktales Adenokarzinoms des Pankreas jedoch offensichtlich weiterhin von der onkogenen Kooperation mittels Aktivierung oder Inaktivierung anderer Signalwege abhängig ist (siehe Abbildung 3). Als möglicher

Kooperationspartner von mutiertem Kras wird NFATc1 diskutiert, dessen Überexpression in humanen PDAC imponierte (Buchholz et al., 2006).

1.2.3 Der Ca^{2+} /Calcineurin/NFAT-Signalweg

Die NFAT- (**N**uclear factor of **a**ctivated **T**-cells) Transkriptionsfaktoren wurden zuerst als Regulatoren der T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung entdeckt (Shaw et al., 1988). Die NFAT Familie besteht aus 5 Isoformen: vier Calcium/Calcineurin-regulierte Isoformen NFATc1 (NFATc, NFAT2), NFATc2 (NFAT1), NFATc3 (NFAT4) und NFATc4 (NFAT3) und das durch osmotischen Stress regulierte NFAT5 (tonicity enhancer binding protein (TonEBP)).

Die Primärstruktur von NFAT ist in Abbildung 4 dargestellt: Sie umfasst eine regulatorische Domäne (NFAT-homologe Region(NHR)), eine Rel-homologe Region, welche Sequenzähnlichkeit zur DNA-Bindungsdomäne der Proteine der Rel-Familie besitzt, und eine C-terminale Domäne. Die Serin-reichen Regionen (SRR) 1-2 sowie die Serin-Prolin reichen Regionen (SP) 1-3 in der NHR sind in ruhenden Zellen stark phosphoryliert. Außerdem weist die NHR die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), eine Transaktivierungsdomäne (TAD) zur Bindung von Co-Faktoren und eine Calcineurin-Bindungsregion auf (König et al., 2010).

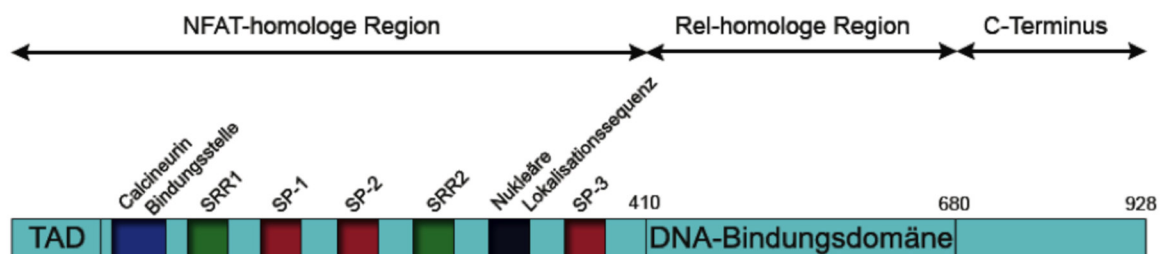


Abbildung 4: Primärstruktur der NFAT-Transkriptionsfaktoren in schematischer Darstellung (nach Koenig et al., 2010)

TAD: Transaktivierungsdomäne, SRR: Serin reiche Region, SP: Serin-Prolin reiche Region. Die angegebenen Zahlen stehen für die Anzahl der Aminosäuren.

Im Zytoplasma liegt NFAT im inaktiven Zustand stark phosphoryliert an der NHR vor. Kommt es zur spezifischen Ligandenbindung an der Zelloberfläche, wird der NFAT-Signalweg, der in Abbildung 5 dargestellt ist, über die Phospholipase C

aktiviert. Die Phospholipase C setzt Inositoltrisphosphat (IP_3) aus Phospholipiden frei, welches wiederum über IP_3 –Rezeptoren zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führt. Calcium aktiviert „*Calcium release activated channels*“ (CRAC), welche den Calciumspiegel erhöhen und gleichzeitig aufrechterhalten (König et al., 2010). Daraufhin wird die Phosphatase Calcineurin über Calmodulin durch Calcium aktiviert und dephosphoryliert die Serin-reichen Sequenzen von NFATc1 in der NHR (Beals et al., 1997a). Dadurch wird die nukleäre Lokalisationssequenz demaskiert, sodass NFATc1 und Calcineurin in den Kern translozieren (Buchholz et al., 2006).

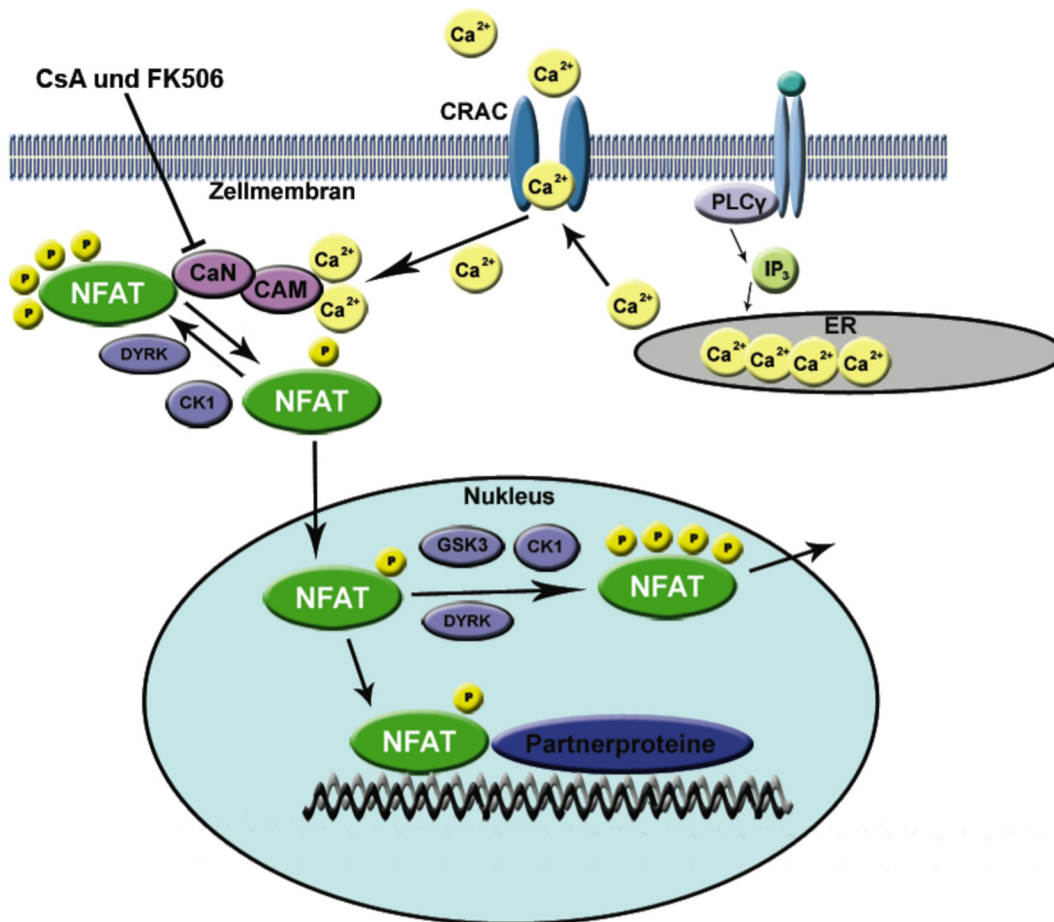


Abbildung 5: Ca²⁺/Calcineurin/NFAT-Signalweg in schematischer Darstellung (modifiziert nach Mancini und Toker, 2009).

Die Phospholipase C γ (PLC γ) wird durch Rezeptoren wie z.B. den T-Zellrezeptor aktiviert. Durch das Hydrolyseprodukt Inositoltrisphosphat (IP₃) wird die Ca²⁺-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum induziert. Die erhöhte Ca²⁺-Konzentration sorgt über eine Aktivierung von „Calcium Release Activated Channels“ (CRAC) zu einem kontinuierlichen Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellulärraum. An Ca²⁺ gebundenes Calmodulin (CAM) interagiert mit der Phosphatase Calcineurin (CaN) und katalysiert die Dephosphorylierung von zytoplasmatischem NFAT. Dephosphoryliertes NFAT transloziert in den Zellkern und aktiviert gemeinsam mit Partnerproteinen die Transkription an Zielpromotoren. Die nukleären Exportkinasen Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), Casein Kinase 1 (CK1) und die „dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated-kinase“ (DYRK) bewirken durch die Rephosphorylierung einen Re-Export ins Zytoplasma. Im Zytoplasma wird NFAT durch die Erhaltungskinasen DYRK und CK1 hyperphosphoryliert und dadurch vor einem Export bewahrt. Cyclosporin A (CsA) und FK506 können über eine Hemmung von Calcineurin den NFAT-Signalweg blockieren.

Im Kern angekommen, binden NFAT-Proteine an die DNA-Erkennungssequenz GGAAA an Promotoren von Zielgenen. Genomweite DNA-Bindungsstudien der AG Ellenrieder deuten weiterhin darauf hin, dass NFATc1 an distal gelegenen „Enhancer-Sequenzen“ bindet und so die Expression von Onkogenen, wie z.B.

Wnt-Proteine oder „*epidermal growth factor receptor*“ (EGFR), reguliert (Baumgart et al., 2014). Diese Bindung erfolgt als Homodimer oder als Heterodimer mit anderen Transkriptionsfaktoren. So bildet NFATc1 im Pankreaskarzinom z.B. einen Komplex mit dem Ets-like-Factor-1 (Elk-1) und stimuliert folglich über die Aktivierung des c-myc Onkogens die Zellzyklusprogression und damit das Wachstum (König et al., 2010). Andererseits interagiert NFATc1 mit der Histon-Methyltransferase Suv39H1 am Promotor des Tumorsuppressors p15 und hemmt dessen Expression (Baumgart et al., 2012). Da weitere Transkriptionsfaktoren (z.B. STAT3 oder NF- κ B) zusammen mit NFATc1 unterschiedliche Funktionen ausüben und die Intensität der DNA-Bindung maßgeblich von der Interaktion mit Partnern abhängt, scheint die Bindungsspezifität und Funktion (Aktivator oder Repressor) von NFATc1 von dessen Partnerproteinen abhängig zu sein (König et al., 2010).

Zum Export aus dem Kern wird NFATc1 zunächst durch die „*dual-specificity tyrosine kinase*“ (DYRK) markiert und anschließend von GSK3 phosphoryliert. Hierdurch wird die Kernexportsequenz freigelegt, sodass NFATc1 aus dem Zellkern wandert. Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe deckten weiterhin auf, dass GSK3 NFAT-Proteine durch Schutz vor einem proteasomalen Abbau stabilisiert und dadurch deren onkogene Funktion stimuliert (Beals et al., 1997b; Singh et al., 2011). Im Zytosol angekommen, wird der Re-Import in den Kern durch CK1 und DYRK Erhaltungskinasen wie c-Jun N-terminale Kinase (JNK), extrazellulär Signal-Regulierte Kinase (ERK), p38 mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) und durch Casein Kinasen kontrolliert (König et al., 2010).

1.2.4 Die Bedeutung von NFATc1 in der Pankreaskarzinogenese

Zusätzlich zu Funktionen im Immunsystem reguliert NFAT auch Entwicklungsprozesse anderer Organsysteme wie z.B. im Herzen, im Skelettmuskel, in der glatten Muskulatur, in Blutgefäßen, in Neuronen, in Knochen, in der Haut und im Pankreas (Muller und Rao, 2010). Des Weiteren konnten wichtige Funktionen von NFATc1 in der Karzinogenese vieler Tumoren gezeigt werden (Mancini und Toker, 2009). So konnte neben einer

Überexpression von NFATc1 in mehreren gastrointestinalen Tumoren auch eine Assoziation mit einem aggressiven Phänotyp des duktales Adenokarzinoms des Pankreas nachgewiesen werden (König et al., 2010). Die Relevanz von NFATc1 in der Genese des Pankreaskarzinoms konnte durch verschiedene weitere Beobachtungen untermauert werden: Buchholz et al. wiesen in 69,5 % der untersuchten humanen Pankreasgewebe eine progrediente Überexpression von nukleärem NFATc1 in späten Vorläuferläsionen und PDACs nach, während in gesundem Pankreasgewebe keine Expression detektiert werden konnte. Weiterhin wurde eine Inflammations-abhängige Induktion von NFATc1, vermittelt durch das Cytokin TGF- β , in Pankreaskarzinomzellen identifiziert und charakterisiert (Singh et al., 2010). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen NFATc1-abhängig ist. Mechanistisch moduliert NFATc1 die Expression von Schlüssel-Zellzyklus-Regulatoren wie z.B. CDK 4/6 und Cyclin D1/D3, zudem wird die c-myc Expression verstärkt, während die Expression des Tumorsuppressors p15 gehemmt wird (Baumgart et al., 2012; Buchholz et al., 2006; Singh et al., 2010). Die identifizierte onkogene Kooperation mit dem Kras Zielgen Elk-1, welche zur Beschleunigung des Zellzyklusprogresses und damit des Zellwachstums führt, unterstreicht die tumorfördernden Eigenschaften von NFATc1 (König et al., 2010).

Zur Überprüfung der biologischen Relevanz einer NFATc1-Aktivierung im Pankreaskarzinom *in vivo* wurde von der Arbeitsgruppe Ellenrieder ein Mausmodell generiert, das konstitutiv nukleäres NFATc1 (c.n.NFATc1) Pankreas-spezifisch unter der Kontrolle des ROSA26-Promotors exprimiert (Abbildung 6). Das c.n.NFATc1-Genkonstrukt war dabei mit einem genaufwärts befindlichen Stop-Codon versehen. Die Verpaarung mit Mäusen, welche die „Cause of Recombination“ (Cre)-Rekombinase unter den Pankreas-spezifischen Promotoren P48 und PDX1 exprimieren, führte bei den Nachkommen durch Exzision der Stop-Codons zur Pankreas-spezifische Expression von c.n.NFATc1.

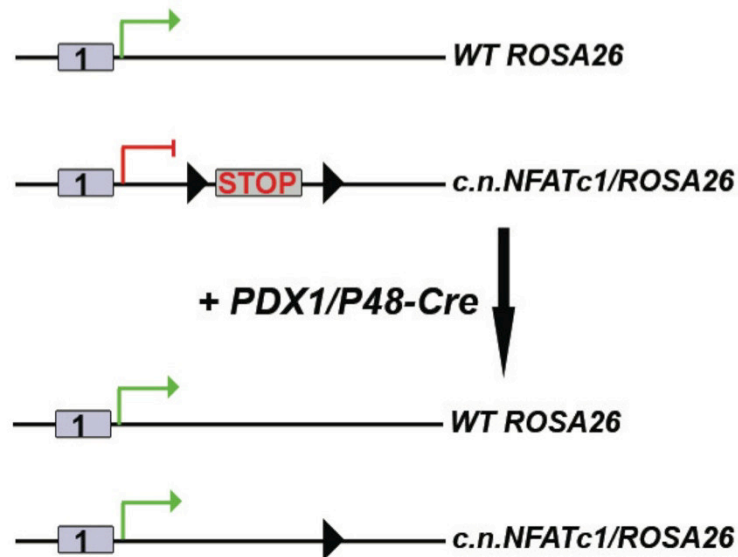


Abbildung 6: Cre-vermittelte Aktivierung von *c.n.NFATc1*

Das Genkonstrukt für konstitutiv nukleäres *NFATc1* (*c.n.NFATc1*) wurde in das erste Intron des Genlokus *ROSA26* durch homologe Rekombination eingebracht, während das zweite Allel als Wildtyp (WT)-Allel unbeeinträchtigt blieb. Zur Expression von *c.n.NFATc1* im Pankreas mussten jedoch die inserierten Stop-Codons exzidiert werden. Die Pankreas-spezifischen Promotoren *PDX1* oder *P48* dienen hier der Expression der Cre-Rekombinase. Mithilfe der Cre-Rekombinase wurden die Stop-Sequenzen an den vorgesehenen lox-Stellen (Dreiecke) ausgeschnitten, sodass *c.n.NFATc1* Pankreas-spezifisch exprimiert wurde.

Pankreata dieser transgenen *c.n.NFATc1*;*P48/PDX1-Cre*- (im folgenden als *c.n.NFATc1* bezeichnet) -Mäuse zeigten im Vergleich zu *P48/PDX1-Cre*-exprimierenden Kontrollmäusen eine erhöhte Zellproliferation nach vier Wochen (repräsentativ in Abbildung 7). So wiesen Pankreata von *c.n.NFATc1*-Mäusen ab einem Alter von sechs Monaten hohe Apoptoseraten und eine progressive Gewebeatrophie auf. Nach einer Beobachtungszeit von über einem Jahr konnte ein proliferationsfördernder Einfluss von *NFATc1* untermauert werden, wobei in keiner der untersuchten Mäuse PanIN-Läsionen oder PDACs nachgewiesen werden konnten (unveröffentlichte Daten von AG Ellenrieder)

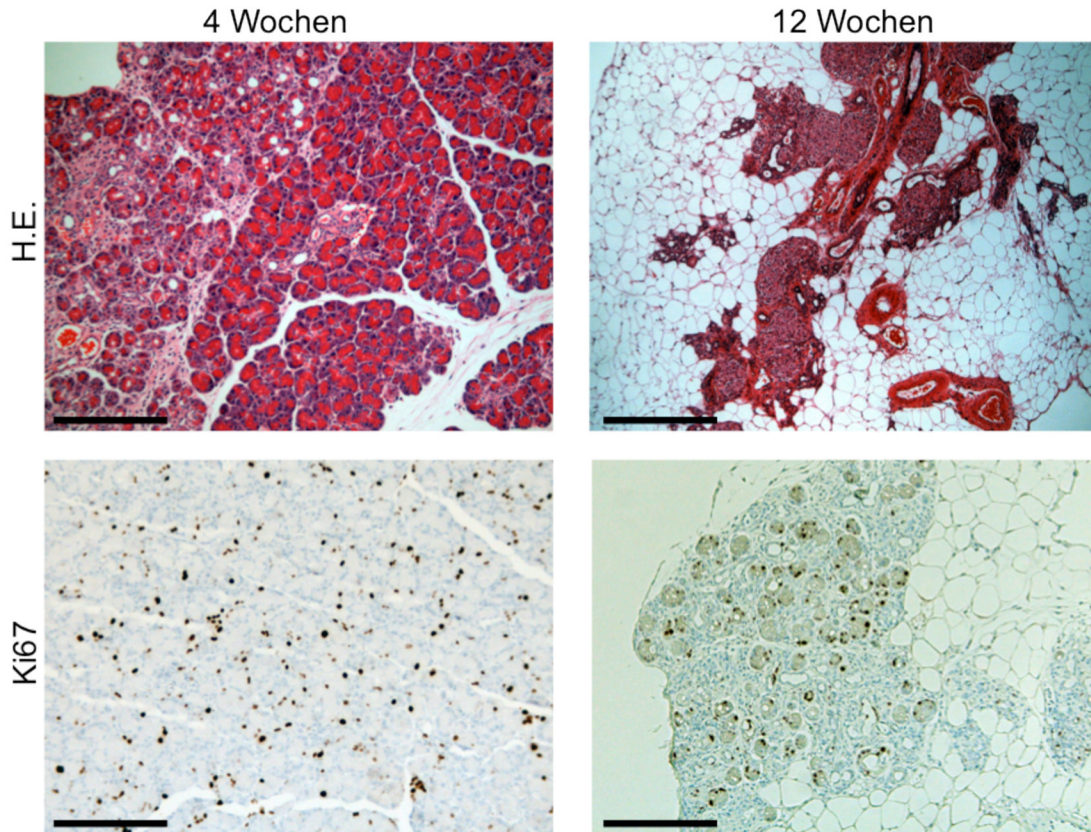


Abbildung 7: Proliferierende und apoptotische Pankreaszellen von *c.n.NFATc1;P48/PDX1-Cre*-Mäusen.

Die Mauspankrea der *c.n.NFATc1;P48/PDX1-Cre*-Mäuse im Alter von 4 Wochen wiesen zunächst stark proliferierendes Gewebe auf, welches jedoch zunehmend durch atrophisches Gewebe im Alter von 12 Wochen ersetzt wurde. Selten konnten dysplastische Areale festgestellt werden. Dargestellt sind 10fach vergrößerte, H.E. gefärbte (oben) und immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Ki67 markierte und mit Hämalaun gegengefärbte (unten) Gewebeschnitte. Die braun markierten Zellkerne zeigen proliferierende Zellen an. Die Skalierung entspricht 200 µm.

1.3 Ziel der Arbeit

Das duktales Pankreaskarzinom entsteht als Folge gut definierter genetischer und nur unzureichend verstandener epigenetischer Alterationen. Von zentraler Bedeutung ist hierbei die Aktivierung onkogener Signalwege und der Verlust tumorhemmender Kontrollmechanismen (Hanahan und Weinberg, 2011). Die Aktivierung des NFAT-Signalweges und dessen onkogenes Potenzial konnte im Kontext einer Kras Mutation sowohl in Zellkulturmodellen als auch im humanen Pankreaskarzinomgewebe bestätigt werden. Im transgenen Mausmodell konnte

allerdings gezeigt werden, dass die alleinige Aktivierung von NFATc1 zwar proliferative Eigenschaften aufweist, jedoch nicht ausreicht, um die PanIN-Bildung oder die Entstehung eines PDAC zu initiieren. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass NFATc1 nur über eine Kooperation mit weiteren onkogenen Ereignissen seine tumorfördernden Eigenschaften ausübt. Von besonderem Interesse ist hierbei eine onkogene Kras Mutation, die in der Mehrzahl humaner PDAC vorliegt und in ca. 70% mit einer Aktivierung von NFATc1 assoziiert ist. Somit simuliert das in dieser Arbeit vorgestellte Mausmodell durch eine Kombination von konstitutiv aktivem NFATc1 und einer Kras^{G12D}-Mutation einen häufig im humanen PDAC auftretenden Zustand und soll helfen, die Mechanismen des NFATc1 Signalweges und der vermuteten onkogenen Kooperation mit mutiertem Kras besser verstehen zu können.

Hierzu ergeben sich folgende Fragen:

1. Begünstigt eine gemeinsame Aktivierung von NFATc1 und Kras die Entstehung von Pankreaskarzinomen im Sinne einer onkogenen Kooperation?
2. Wird die Kras^{G12D} bedingte Entstehung von prämaligen Vorstufen durch konstitutiv aktives NFATc1 beeinflusst?
3. Welche Mechanismen liegen der vermuteten Kooperation von NFATc1 und Kras^{G12D} zugrunde?

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Stiefenhofer (München)
Brutschrank	Heraeus Instruments (Dreieich)
Eismaschine	Ziegra Eis (Isernhagen)
Elektrophoresekammer	Thermo Scientific (Dreieich)
Entwicklermaschine für Westernblot Curix 60	Agfa (Mortsel, Belgien)
Feinwaage Mettler PM400	Mettler-Toledo GmbH (Gießen)
Gefriertruhe	Heraeus Instruments (Dreieich)
Heizblock	Techne (Großbritannien)
Heizplatte	Medax (Kiel)
Kühlschrank	Liebherr (Lindau)
Kühlzentrifuge Micro 200R	Hettich Zentrifuge (Tuttlingen)
Messgerät für Bradford	Thermo Scientific (Langenselbold)
Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)
Mikrotom	Leica (München)
Mikrowelle	Whirlpool (Schweden)
Paraffineinbettautomat	Reichert-Jung (Heidelberg)
PCR-Thermocycler	BioRad (München)
pH-Meter 761 Calimatic	Knick (Berlin)
Schüttler	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Stickstofftank	Tec-Lab (Idstein)
UV-Scanner	Kaiser (Gemünden)
Voltmeter für Western Blot	Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA)
Vortexer MS1 Minishaker	IKA Staufen
Wasserbad	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)

Western Blot Kammer	BioRad (München)
---------------------	------------------

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte

2.2 Materialien

Material	Hersteller
Blotpapier Whatman	Schleicher & Schüll (Dassel)
Cryoröhrchen 2ml	Greiner Bio-One (Frickenhäusen)
Deckgläschen	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Eppendorfggefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Nürnberg), Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Fotokassette	Stratagene (Heidelberg)
Geltaschenkamm	Thermo Scientific (Dreieich)
Glaswaren	Schott (Mainz)
Klammern für Gelelektrophorese	Thermo Scientific (Dreieich)
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll (Dassel)
Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Pipetboy	Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten	
- 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
- 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt (Nürnberg)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Röntgenfilm (18x24 cm)	Amersham Pharmacia (Freiburg)

Tabelle 2: Verwendete Materialien

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamidlösung	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Agarose	Sigma Aldrich GmbH (Steinheim)
Amersham™ ECI advanced Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences (Freiburg)
Amersham™ ECI plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences (Freiburg)
Amersham™ ECI Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences (Freiburg)
Antikörper Diluent	Dako (Dänemark)
Aqua dest.	Fresenius Kabi AG (Bad Homburg)
β-Mercaptoethanol	Invitrogen (Karlsruhe)
BioRad Protein Assay	BioRad (München)
Bovine Serum Albumin (BSA, 10mg/ml)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
Diaminobenzidin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Eosin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ethylenglykolbis(aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Formaldehyd	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
GeneRuler™ 1kB DNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)

Glycerin (87%)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
GoTaq-Polymerase	Promega (Mannheim)
GoTaq-Puffer	Promega (Mannheim)
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
HEPES	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Milchpulver	SIGMA (Deisenhofen)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natronlauge	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
NP-40	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Orthovandat	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Paraffin	Vogel GmbH (Gießen)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Roche Molecular Diagnostics (Mannheim)
Ponceaurot	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Proteaseinhibitor-Tablette (complete mini)	Roche Molecular Diagnostics (Mannheim)
Proteinase K (20mg/ml)	Upstate (Schwalbach)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tris Base (0,2 M, 0,25 M, 1,5 M)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Triton-X-100	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Tween® 20	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Wasserstoffperoxid (20%)	Merck (Darmstadt)
Xylol	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

2.4 Transgene Mauslinien

Die für diese Arbeit benötigten Mäuse sollten Pankreas-spezifisch konstitutiv aktives NFATc1 und konstitutiv aktives Kras exprimieren. Hierzu mussten insgesamt drei Mauslinien miteinander gekreuzt werden: eine für konstitutiv aktives NFATc1 (*c.n.NFATc1*) kodierende, eine für konstitutiv aktives Kras (*Kras^{G12D}*) kodierende und eine Pankreas-spezifisch Cre-Rekombinase (*P48/PDX1-Cre*) exprimierende Mauslinie.

Um die konstitutive Aktivität von NFATc1 zu erlangen, wurde, wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt, ein Austausch von 13 Serinen durch Alanin durchgeführt.

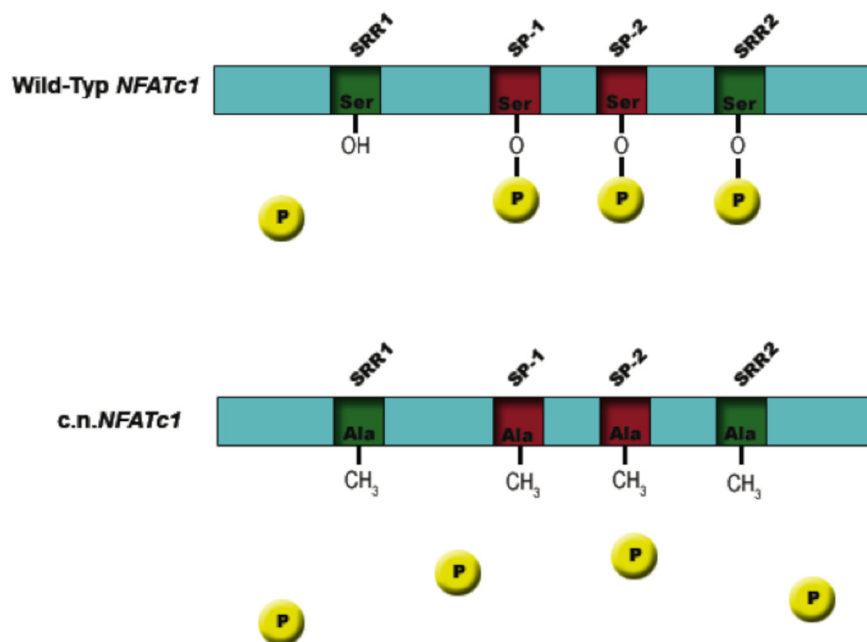


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Genkonstrukts für konstitutiv nukleäres NFATc1

SRR: Serin-rich region, SP: Serin-Prolin-rich region. Die Inaktivierung durch den Kernexport von NFATc1 wird durch den Austausch von Alanin gegen Serin an 13 verschiedenen Loci verhindert. *C.n.NFATc1* kann nicht mehr phosphoryliert werden, sodass es im Kern und somit im aktiven Zustand verbleibt.

Hierdurch konnte NFATc1 nicht mehr phosphoryliert und damit aus dem Zellkern exportiert werden, sodass eine dauerhafte nukleäre Lokalisation und transkriptionelle Aktivität von NFATc1 stimuliert wurde. Dieses Konstrukt wurde

zusätzlich zu einem N-terminalen Hämagglutinin (HA)-Marker genaufwärts mit einem sogenannten loxP-Stop-loxP Konstrukt versehen. loxP ist ein Genabschnitt aus dem Bacteriophagen P1, welcher zwei palindromische Sequenzen enthält, d.h. Sequenzen, welche sowohl vor- als auch rückwärts gelesen werden können (Sternberg und Hamilton, 1981). Diese loxP-Stellen konnten anhand der palindromischen Sequenzen durch die Cre-Rekombinase erkannt werden. Hierfür wurden die beschriebenen Mäuse mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Mäusen gekreuzt (siehe Abbildung 9). Die zur Kreuzung benötigte *p48Cre*-Mauslinie wurde von Nakhai et al. beschrieben und zur Verfügung gestellt (Nakhai et al., 2007), die *PDX1-Cre*-Mauslinie von Gu et al. (Gu et al., 2002). Die Cre-Rekombinase exzidierte das Stop-Codon, welches von den loxP-Stellen flankiert war. Da dieses Genkonstrukt in den Genlocus von ROSA-26 inseriert wurde, begann nach Cre-vermittelter Exzision des Stop-Codons die Expression von *HA* und *c.n.NFATc1* unter dem schwachen Promotor von ROSA-26.

Die Erstellung des Mausmodells erfolgte durch Artemis Pharmaceuticals (Köln).

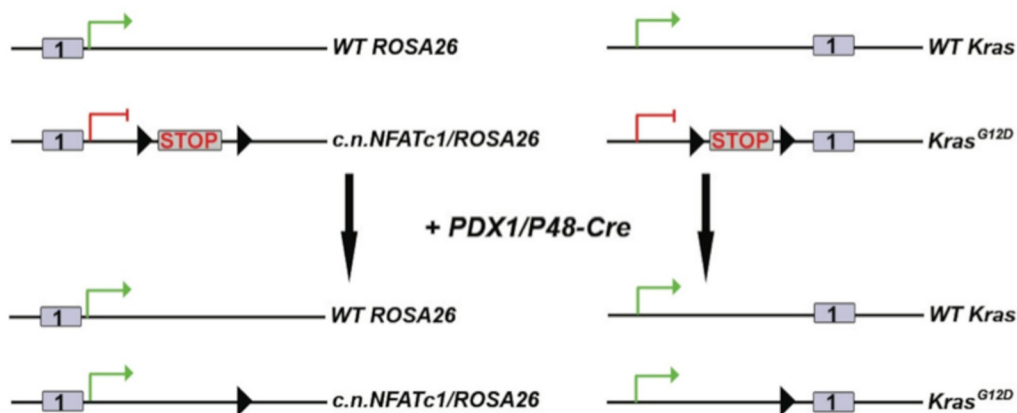


Abbildung 9: Cre-vermittelte Aktivierung der inserierten Gene *c.n.NFATc1* und *Kras^{G12D}*

Das Genkonstrukt für konstitutiv nukleäres *NFATc1* (*c.n.NFATc1*) wurde in das erste Intron des Genlokus ROSA26 durch homologe Rekombination eingebracht, während das zweite Allel als Wildtyp (WT)-Allel unbeeinträchtigt blieb. Ebenso wurde am Genlocus von *Kras* auf einem Allel über homologe Rekombination eine Modifikation vorgenommen, welche zu konstitutiv aktivem *Kras* führt (*Kras^{G12D}*). Zur Expression der veränderten Genabschnitte im Pankreas mussten jedoch die inserierten Stop-Codons exzidiert werden. Die Pankreas-spezifischen Promotoren PDX1 oder P48 dienten hier der Expression der Cre-Rekombinase. Mithilfe der Cre-Rekombinase wurden die Stop-Sequenzen an den vorgesehenen lox-Stellen (Dreiecke) ausgeschnitten, sodass sowohl *c.n.NFATc1* als auch *Kras^{G12D}* Pankreas-spezifisch exprimiert wurden.

Für die *Kras^{G12D}* Mauslinie wurde ein Genkonstrukt mit loxP-Stop-loxP-Gruppe aufwärts eines *Kras*-Locus inseriert, welcher einen Austausch von Glycin zu Aspartat an Exon 1 in Codon 12 (*Kras^{G12D}*) aufwies (Hingorani et al., 2003). Zur Expression musste daher auch eine Verpaarung mit Cre-exprimierenden Mäusen durchgeführt werden (siehe Abbildung 9). So wurde die kontinuierliche, Pankreas-spezifische Stimulierung des *Kras*-Signalweges herbeigeführt, indem die exprimierten *Kras^{G12D}*-Proteine sowohl die intrinsische, als auch die extrinsische GTPase-Aktivität aufhoben.

Diese Mauslinie wurde vom Labor von Jackson et al. beschrieben und zur Verfügung gestellt (Jackson et al., 2001).

2.5 Haltung und Zucht der Mäuse

Alle Mäuse wurden in speziellen Käfigen im Tierstall des Biomedizinischen Forschungszentrums der Universität Marburg gehalten. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter sterilen Bedingungen, welche unter anderem durch Schleusen für Material und Personal sichergestellt wurden. Außerdem herrschte eine konstante Temperatur von 21 (± 1)°C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 55 (± 5)% und ein Tag-Nacht-Rhythmus, der durch ein Beleuchtungs- zu Dunkelheitsintervall von jeweils 12 Stunden vorgegeben war. Die Ernährung der Mäuse wurde durch Standardzuchtfutter und Wasser ad libitum sicher gestellt.

Zur Zucht der dreifach-transgenen Mäuse (*c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48/PDX1-Cre*) und der Kontrollmäuse (*Kras^{G12D};P48/PDX1-Cre*) wurden jeweils ein Männchen und zwei Weibchen in einem Käfig zusammen gehalten. Die Auswahl der Mäuse wurde anhand der genetischen Typisierungsergebnisse durchgeführt. So wurden Mäuse des Genotyps *P48/PDX-1-Cre* mit Mäusen des Genotyps *Kras^{G12D};c.n.NFATc1* verpaart. Hierbei musste beachtet werden, dass jeweils die beiden Weibchen eines Käfigs den gleichen Genotyp bezüglich der artifiziell inserierten Gene aufwiesen. Ab einem Alter von 21 Tagen wurden die Jungtiere in nach Geschlechtern sortierte Käfige aufgeteilt und hierbei mit nummerierten Ohrclips markiert, nachdem ein Mausschwanzbiopsat bis zu einer Länge von ca. 2 mm zur Genotypisierung entnommen worden war.

2.6 Genotypisierung der Mäuse auf *NFATc1*, *Kras^{G12D}* und *Cre*

Nach Entnahme einer Mausschwanzbiopsie wurde zunächst die DNA extrahiert, und mittels spezifischer Primer eine Polymerasekettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifizierung durchgeführt. Anschließend konnte durch gelelektrophoretische Auftrennung im Agarosegel das Vorliegen oder die Abwesenheit des gesuchten Genotyps beurteilt werden.

2.6.1 DNA-Extraktion aus einer Mausschwanzbiopsie

Die Mausschwanzbiopsien wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß mit je 200 μ l PBND-Puffer und 30 μ l Proteinase K (Upstate, Schwalbach) versetzt, was die

Lyse der Zellen und Freisetzung der DNA bewirkte. Nach etwa 12 Stunden im Schüttler bei 55 °C und anschließender, kurzer Zentrifugation wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C im Heizblock erhitzt, um die Proteinase K zu inaktivieren. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben auf Eis gelagert oder bei -20°C zur späteren Verwendung eingefroren.

PBND-Puffer

50 mM	HEPES
150 mM	NaCl
2,5 mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O
0,45%	NP-40
0,45%	Tween 20

Tabelle 4: Zur DNA-Extraktion eingesetzter Puffer

2.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR diente der Vervielfältigung bestimmter Gensequenzen mittels spezifischer Primer zur anschließenden Identifizierung der inserierten Genkonstrukte. Die spezifischen Primer und Reaktionsansätze sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 dargestellt.

Die PCR bestand aus den Einzelschritten Denaturierung, Annealing und Elongation, wobei das genaue Schema in Tabelle 7 dargestellt ist (Mülhardt, 2009). Hierbei diente die aus den Proben extrahierte DNA als Template. Die einzelnen Schritte erforderten jeweils einen spezifischen Temperaturbereich, wofür ein PCR-Thermocycler zur Verfügung stand. In der Phase der Denaturierung wurde die DNA erhitzt, um auf diese Weise die Wasserstoffbrücken zu trennen und Einzelstrang-DNA zu erzeugen. An diese Einzelstränge lagerten sich in der Phase des Annealings spezifische Oligonukleotidprimer an. In der Phase der Elongation fand die Synthese der DNA statt. Hierfür wurde das Enzym Taq-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) benötigt. So wurden mithilfe der

passenden Primer nur jeweils die DNA-Fragmente vervielfacht und anschließend ausgewertet, welche die gewünschte Gensequenz enthielten.

Als Positivkontrolle dienten Proben einer genotypisch bekannten Maus.

Primer	Sequenz	Firma
<i>c.n.NFATc1</i> forward	5'-cat gtc tgg gag atg gaa gc-3'	Biomers (Ulm)
<i>c.n.NFATc1</i> reverse	5'- tct cga gct act tgt cat cg-3'	Biomers (Ulm)
<i>Kras^{G12D}</i> forward	5'-agc tag cca cca tgg ctt gag taa gtc tgc g-3'	Biomers (Ulm)
<i>Kras^{G12D}</i> reverse	5'-cct tta caa gcg cac gca gac tgt aga -3'	Biomers (Ulm)
<i>Cre</i> forward	5'-acc agc cag cta tca act cg-3'	Biomers (Ulm)
<i>Cre</i> reverse	5'-tta cat tgg tcc agc cac c-3'	Biomers (Ulm)

Tabelle 5: Für die Genotypisierung verwendete Primer

***c.n.NFATc1*-PCR-Mix**

10 µl	REDTaq [®] ReadyMix [™]
7 µl	H ₂ O
20 pmol	NFATc1 forward
20 pmol	NFATc1 reverse
2 µl	Probe

***Kras*^{G12D}-PCR-Mix**

0,25 µl	GoTaq
5 µl	GoTaq Puffer
0,5 µl	dNTP
14,75 µl	H ₂ O
20 pmol	<i>Kras</i> ^{G12D} forward
20 pmol	<i>Kras</i> ^{G12D} reverse
2 µl	Probe

***Cre*-PCR-Mix**

10 µl	REDTaq [®] ReadyMix [™]
7 µl	H ₂ O
20 pmol	<i>Cre</i> forward
20 pmol	<i>Cre</i> reverse
2 µl	Probe

Tabelle 6: Zur Genotypisierung verwendete PCR-Reaktionsansätze**PCR-Programm für *c.n.NFATc1***

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1. Denaturierung	95 °C	5 min	35x
2. Denaturierung	95 °C	0,5 min	
3. Annealing	60 °C	0,5 min	
4. Elongation	72 °C	1 min	
5. Elongation	72 °C	10 min	

PCR-Programm für *Kras*^{G12D}

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1. Denaturierung	95 °C	2 min	29x
2. Denaturierung	95 °C	0,5 min	
3. Annealing	60 °C	0,5 min	
4. Elongation	72 °C	1 min	
5. Elongation	72 °C	5 min	

PCR-Programm für *Cre*

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1. Denaturierung	95 °C	4 min	35x
2. Denaturierung	95 °C	0,5 min	
3. Annealing	59 °C	0,5 min	
4. Elongation	72 °C	0,5 min	
5. Elongation	72 °C	5 min	

Tabelle 7: Zur Genotypisierung verwendete PCR-Programme**2.6.3 Gelelektrophoretische Auftrennung im Agarosegel**

Das Agarosegel zur Auftrennung der amplifizierten DNA-Banden wurde in einen vorbereiteten Schlitten mit zwei darin befindlichen Kämmen gegeben. Die Kämmen wurden nach 30 Minuten aus dem festen Gel entfernt und der Schlitten mit dem Gel in eine mit TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Im Anschluss wurden je 10 µl des *c.n.NFATc1*-PCR-Mix des *Cre*-PCR-Mix, oder des *Kras*^{G12D}-PCR-Mix in die durch die Kämmen entstandenen Taschen pipettiert.

Der *Kras*^{G12D}-PCR-Mix wurde zuvor noch mit 3 µl eines Ladepuffers versehen. Durch Anlage einer Spannung von 120 mV erfolgte die Auftrennung der DNA-

Fragmente. Hierbei durchliefen große DNA-Fragmente das Gel aufgrund der Siebstruktur der Agarose langsamer als kleinere Fragmente (Mülhardt, 2009).

1% Agarose-Gel

0,5 g	Agarose
50 ml	TBE Puffer (1x)
0,8 µl	Ethidiumbromid (10mg/ml)

TBE-Puffer

(1x):

10,8 g	Tris
5,5 g	Borsäure
0,37 g	EDTA

Der TBE-Puffer wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt.

PCR-Ladepuffer

30%	Glycerol
0,1 mM	EDTA
0,25%	Bromophenolblau

Tabelle 8: Für die PCR und das Agarosegel verwendete Puffer und Lösungen

2.6.4 Auswertung der PCR

Das Gel mit den aufgetrennten DNA-Fragmenten wurde auf einen Transilluminator aufgelegt. Von oben appliziertes UV-Licht ließ die mit Ethidiumbromid interkalierten, amplifizierten DNA-Fragmente aufleuchten und eine integrierte Kamera ermöglichte die Dokumentation des Ergebnisses.

2.7 Tötung der Mäuse und Entnahme der Organe

Die Versuchsplanung sah vier verschiedene Tötungszeitpunkte für Mäuse im Alter von zwei, vier, acht, und zwölf Wochen vor. Hierzu wurden je 3-5 Tiere jedes gewünschten Genotyps, also *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48/PDX-1-Cre* (von nun an als *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäuse bezeichnet) und als Kontrollmäuse *Kras^{G12D};P48/PDX1-Cre* (von nun an als *Kras^{G12D}*-Mäuse bezeichnet) zu den genannten Zeitpunkten geopfert. Darüber hinaus wurde zur Erstellung einer Überlebenskurve eine Population von 15 *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäusen bis an ihr natürliches Lebensende oder bis Eintritt eindeutiger Schmerzzeichen beobachtet, bis eine Notopferung durchgeführt wurde. Diese Schmerzzeichen beinhalteten eine stark veränderte Körperhaltung, Aktivität und Ernährungszustand der Mäuse und resultierten in jedem Fall in einer Notopferung der betroffenen Tiere.

Der Tod wurde durch zervikale Dislokation herbeigeführt. Anschließend wurden die Tiere fotografiert, mit Hilfe einer Schere wurde eine mediane Laparotomie zur Darstellung des gesamten Abdomens und des Pankreas durchgeführt und dieses entnommen. Soweit es die Größe des jeweiligen Pankreas zuließ, wurde es geteilt und etwa zur Hälfte für die Proteinisolierung und RNA-Extraktion in Cryotubes in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur anderen Hälfte zur histologischen Aufarbeitung in ein mit Formaldehyd gefülltes Gefäß gelegt.

2.8 Aufarbeitung des Gewebes für die histologische Untersuchung

Zur histologischen Begutachtung wurden die Gewebe nach standardisierter Methode in Paraffinblöcke eingebettet, nachdem sie eine aufsteigende Alkoholreihe und ein Xylolbad durchlaufen hatten. Anschließend wurden Serienschnitte der Gewebe mit einer Dicke von 4 µm angefertigt und auf Objektträger übertragen.

2.8.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung (H.E. –Färbung)

Die auf den Objektträgern befindlichen Paraffin-Gewebe-Schnitte wurden zunächst durch je fünf-minütiges, zweimaliges Eintauchen in Xylol entparaffiniert.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte in einer absteigenden Ethanolreihe von 99%, 96%, 80%, 70% und 50% und zweimaligem Eintauchen in destilliertes Wasser für jeweils zwei Minuten rehydriert. Nach fünf-minütiger Färbung mit Hämatoxylin nach Mayer wurden die Gewebeschnitte durch lauwarmes, fließendes Wasser für fünf Minuten gebläut. Daran schloss sich die Färbung mittels 0,5 %-igem Eosin für 30 Sekunden und zweimaligem Spülen des überschüssigen Farbstoffes in destilliertem Wasser an. Mithilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe von 50% - 99% wurden die Gewebeschnitte dehydriert, im Anschluss zweimal für je fünf Minuten in Xylol getaucht, und daraufhin mithilfe von Depex durch ein Deckglas abgeschlossen.

2.8.2 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie wurde zum Nachweis spezifischer Proteine und deren Lokalisation im Gewebe eingesetzt. Hierbei wurden Primärantikörper gegen charakteristische Epitope eines nachzuweisenden Proteins eingesetzt, welche über einen Sekundärantikörper und einen Avidin-Biotin-Enzym-Komplex zur Anfärbung der gesuchten Proteine führten.

Zur Durchführung der immunhistochemischen Färbung wurden die Paraffin-Gewebeschnitte für je zwei Mal fünf Minuten in Xylol entparaffiniert. Anschließend wurde, wie bei der H.E. Färbung, die Rehydrierung vorgenommen, wobei die Objektträger für je drei Minuten in die Küvetten mit absteigender Ethanolreihe (s.o.) eingetaucht wurden. Nach Spülung in destilliertem Wasser wurden die Objektträger 20 Minuten im Puffer gekocht, um die durch Formaldehyd entstandenen Vernetzungen von Proteinen zu lösen (Sprich, 2006), wobei je nach beabsichtigter Antikörperinkubation ein Tris/EDTA (TE)-Puffer oder ein Citratpuffer zum Einsatz kamen. Daraufhin wurde nach einer 20-minütigen Abkühlung bei Raumtemperatur und einem erneuten Spülvorgang mit destilliertem Wasser die endogene Peroxidase durch ein zehnminütiges Bad in einer mit 3%igem Wasserstoffperoxid gefüllten Küvette blockiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Gewebe auf den Objektträgern mit ca. 100 µl 2%-iger Bovines Serum Albumin (BSA)-Lösung bedeckt und 20 Minuten in

einer feuchten Kammer belassen. Nun wurden die Objektträger mit ca. 100 µl des durch Antikörper-Diluent verdünnten Primärantikörpers über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert.

Der 2. Arbeitstag begann mit Spülung in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween (TBST) und Inkubation mit in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) verdünntem, biotinyliertem Sekundärantikörper für 30 Minuten in einer feuchten Kammer. Die Gewebeschnitte wurden mit TBST gespült und 30 Minuten mit dem Avidin-Biotin-Komplex, welcher aus Avidin und einer biotinylierten Meerrettichperoxidase besteht, inkubiert (ABC-Methode). Nach der Spülung mittels TBST und TBS wurden je ca. 100 µl des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) hinzugegeben, welches durch die mit dem Avidin-Biotin-Komplex gekoppelte Peroxidase zu einem braunen Farbstoff umgewandelt wurde. Die Reaktion wurde durch die Spülung in destilliertem Wasser beendet und die Gewebeschnitte wurden für 15 Sekunden mittels Hämatoxylin gegengefärbt. Als weitere Schritte wurden eine 5-minütige Bläuung unter Leitungswasser, eine Dehydrierung durch eine aufsteigende Ethanolreihe (s.o.) mit abschließendem Eintauchen in Xylol und Eindeckelung mithilfe von Depex durchgeführt. Die verwendeten Antikörper und Kits sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 zusammengefasst.

Citratpuffer (pH 6,0)

2,1 g Citronensäure-Monohydrat

Die Citronensäure wurde mit 1 l destilliertem Wasser aufgefüllt.

TE- Puffer (10x, pH 9,0)

12,1 g Tris – Base

3,7 g EDTA

Der TE-Puffer wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt.

PBS (pH 7,4)

8g NaCl

0,2 g KCl

0,2 g KH_2PO_4

0,765 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

PBS wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt.

Milchpulver Blockpuffer

2% Milchpulver in PBS

Diaminobenzidin (DAB)

200 mg DAB

200 ml TBS

100 μl Destilliertes Wasser

Tabelle 9: Für die Immunhistochemie verwendete Puffer

Antikörper	Verdünnung	Firma
Amylase	1:1000	Santa Cruz
HA	1:100	CellSignalling
Cytokeratin 18	1:25	Epitomics
Cytokeratin 19	1:50	Santa Cruz
Ki67	1:600	NeoMarkers
COX2	1:100	Epitomics
Hes-1	1:100	Epitomics

Tabelle 10: Für die Immunhistologie verwendete Antikörper

Kit	Firma
Vectastain®ABC Kit Kaninchen	Vector Laboratories (Loerrach)

Tabelle 11: Für die Immunhistologie verwendetes Kit

2.9 Proteinanalyse des entnommenen Pankreasgewebes

Neben der histologischen Auswertung des Pankreasgewebes spielte die Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot eine entscheidende Rolle beim Verständnis der Karzinogenese in den beschriebenen Mausmodellen. Hierzu wurde zunächst der Proteinbestandteil der Pankreasgewebe isoliert, bevor die Bestandteile des Proteoms mithilfe eines Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gels aufgetrennt und anschließend durch spezifische Antikörper markiert und sichtbar gemacht wurden.

2.9.1 Proteinisolierung

Für die Proteinisolierung wurden bei -80 °C gelagerte Pankreasgewebeanteile mit 1 ml Lysepuffer, 40 µl 25x Complete Proteaseinhibitor (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim) und 10 µl Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim) versetzt.

Das Gewebe wurde mechanisch zerkleinert und anschließend zur Auftrennung der Zellbestandteile bei 15000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten bei 4 °C

zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand für Western-Blot-Analysen genutzt, oder bei -80 °C zwischengelagert.

Lysepuffer

50 mM	HEPES (pH 7,5)
150 M	NaCl
1mM	EGTA
10%	Glycerin
1%	Triton X-100
100 mM	NaF
10 mM	Na ₄ P ₂ O ₇ x 10 H ₂ O

Tabelle 12: Für die Proteinisolierung verwendeter Puffer

2.9.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte photometrisch nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976).

Hierzu wurde Proteinassay-Lösung in eine 96-well Platte mit der Probe vermischt und dadurch eine Bindung des Triphenylmethan Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau-G-250 an die enthaltenden Proteine herbeigeführt. Hierdurch verschob sich das Absorptionsmaximum im Photometer von 465 nm auf 595 nm (Rehm und Letzel, 2010). Eine BSA-Lösung mit bekannter Konzentration diente hierbei als Vergleichsprobe. Die Absorption wurde bei 595 nm im Photometer gemessen. Über eine Eichkurve wurden daraus die Proteinkonzentrationen ermittelt, wobei für alle Analysen eine Doppelbestimmung vorgenommen wurde.

Bradford Protein Assay

50 ml	BioRad Protein Assay
200 ml	destilliertes Wasser

Tabelle 13: Für die Proteinbestimmung verwendete Lösung**2.9.3 Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE erlaubte die Auftrennung der Proteine nach deren Molekulargewicht.

Die im Laufpuffer und im Gel enthaltene Seife SDS diente der Neutralisierung der Eigenladung der im Lysat befindlichen Proteine. Durch die Bindung an negativ geladenes SDS waren alle Proteine nach außen negativ geladen und wurden so durch ein konstantes Ladungs-Masse Verhältnis nach ihrem Molekulargewicht entlang des elektrischen Feldes aufgetrennt (Rehm und Letzel, 2010).

Dabei wurde als Trennmedium, je nach erwartetem Molekulargewicht, ein Porenenthaltendes 10%-iges oder 15%-iges Polyacrylamidgel eingesetzt. Zunächst wurden 400 µl Stoppgellösung zwischen die mit Ethanol gereinigten Platten gegeben. Nach der Polymerisation wurden 10 ml Trenngellösung darüber geschichtet. Die oberste Schicht bildete die Sammelgellösung.

In das Sammelgel wurde ein Kamm eingesteckt und das Gel polymerisierte in etwa 40 Minuten bei Raumtemperatur. Die durch den Kamm geformten Taschen wurden mit je 20 µg des Probengemisches gefüllt, nachdem jede Probe mit 5x Lämmli-Puffer und Mercaptoethanol versetzt und bei 95 °C für fünf Minuten denaturiert worden war. Nachdem das Gel in eine Gelelektrophoresekammer gestellt und mit 1x Ladepuffer gefüllt worden war, wurde zunächst eine elektrische Spannung von 120 V angelegt, welche bei Eintritt der Proben ins Trenngel auf 160 V erhöht wurde. Hierbei gelangten kleine Proteine leichter und damit schneller durch die vorgeformten Poren zur Anode als größere Proteine. Als Referenzprobe zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde eine Tasche mit einem Größenmarker gefüllt.

Trenngelpuffer

1,5 M	Tris (pH 8,8)
0,40%	SDS

Trenngellösung (für je 2 10%-Gele)

2,5 ml	Trenngelpuffer
3,67 ml	destilliertes Wasser
3,33 ml	Acrylamidlösung
0,5 ml	Glycerol
25 µl	10% APS (unmittelbar vor Gebrauch hinzuzufügen)
25 µl	TEMED (unmittelbar vor Gebrauch hinzuzufügen)

Trenngellösung (für je 2 15%-Gele)

2,5 ml	Trenngelpuffer
2,0 ml	destilliertes Wasser
5,0 ml	Acrylamidlösung
0,5 ml	Glycerol
25 µl	10% APS (unmittelbar vor Gebrauch hinzuzufügen)
25 µl	TEMED (unmittelbar vor Gebrauch hinzuzufügen)

Stoppgellösung (für 2 Gele)

800 µl	Trenngellösung
5 µl	10% APS (unmittelbar vor Gebrauch hinzuzufügen)
5 µl	TEMED (unmittelbar vor Gebrauch hinzuzufügen)

Sammelgelpuffer

0,5 M	Tris-Base (pH 6,8)
0,40%	SDS

Sammelgellösung

25 ml	Sammelgelpuffer
59 ml	destilliertes Wasser
16 ml	Acrylamidlösung
15 µl	10% APS (unmittelbar vor Gebrauch hinzuzufügen)
9 µl	TEMED (unmittelbar vor Gebrauch hinzuzufügen)

Laufpuffer (10x)

288 g	Glycin
60,6 g	Tris
20g	SDS

Der 10x Laufpuffer wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 2 l aufgefüllt.

Laufpuffer (1x)

100 ml	Laufpuffer 10x
900 ml	destilliertes Wasser

5x Lämmli

225 mM	Tris (pH 6,8)
50%	Glycerin
5%	SDS
100 mM	DTT
0,02%	Bromphenolblau

Tabelle 14: Für die Erstellung eines SDS-PAGE verwendete Puffer und Lösungen**2.9.4 Western Blot**

Auch der Western Blot ist ein Antikörper-basiertes Verfahren. Zuerst wurden hierfür die Proteine des SDS-Gels elektrophoretisch auf eine adsorbierende Nitrocellulosemembran transferiert. Die elektrophoretische Übertragung des SDS-Gels auf die Nitrocellulosemembran erfolgte in einer mit Blotting Puffer gefüllten Kassette deren Aufbau sich folgendermaßen gestaltete:

Kathode
Schwamm
Filter
Gel
Nitrocellulosemembran
Filter
Schwamm
Anode

Zwischen Kathode und Anode wurde bei einer Temperatur von 4 °C über 90 Minuten eine Spannung von 400 mA angelegt. Nach der elektrophoretischen Übertragung der Proteine auf die Membran, wurde diese fünf Minuten mit dem Farbstoff Ponceau gefärbt, um so die Übertragung der Proteine auf die Membran zu kontrollieren. In 5%-iger Milch und TBST wurden freie Bindungsstellen auf der Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Zum Nachweis der gesuchten Proteine wurden Primärantikörper zur Bindung an spezifische Epitope eingesetzt. Hierfür wurde die Membran mit Primärantikörpern, welche in Tabelle 16 aufgeführt sind, in entsprechender Verdünnung bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran für dreimal zehn Minuten in 1x TBST gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem in 5 %-igem Milchpulver angesetzten Sekundärantikörper über eine Stunde auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur. Die verwendeten Sekundärantikörper waren an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt und sind in Tabelle 17 dargestellt. Ein weiterer Waschvorgang mit TBST folgte. Anschließend wurden 750 µl ECL-Lösung über die Membran verteilt und für fünf Minuten in Dunkelheit inkubiert. Das darin enthaltene Luminol wurde, katalysiert durch die HRP, oxidiert und führte damit zur Emission von sichtbarem Licht. Dieser als Chemolumineszenz bezeichnete Vorgang machte somit die gesuchten Proteine auf einem Film in einer Dunkelkammer indirekt sichtbar.

TBS-Puffer 10x

0,2 M	Tris
1,37 M	NaCl

TBST-Puffer

1x:

100 ml	10x TBS-Puffer
900 ml	destilliertes Wasser
1ml	Tween 20

Blocking-Puffer

100 ml	1 x TBST
5 g	Milchpulver

Tabelle 15: Für die Übertragung auf die Nitrocellulosemembran verwendete Puffer

Antikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Firma
HA	1:1000	Anti-Maus	Cell Signalling
p16INK4a	1:1000	Anti-Kaninchen	LifeSpan Biosciences
β-Actin	1:20000	(direkt HRP gekoppelt)	Sigma-Aldrich

Tabelle 16: Für die Western-Blot Analyse eingesetzte Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
Anti-Maus	1:10 000	Sigma-Aldrich
Anti-Kaninchen	1:7500	Sigma-Aldrich

Tabelle 17: Für die Western-Blot Analyse eingesetzte Sekundärantikörper**10x Transblotpuffer**

0,25 M	Tris
1,92 M	Glycin

1x Transblotpuffer

100 ml	10x Transblotpuffer
200 ml	Methanol
700 ml	destilliertes Wasser

Tabelle 18: Für den Western Blot verwendete Puffer

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung der Zuchtlinien

Die Bedeutung der NFAT Isoformen in der Karzinogenese maligner Tumoren wurde bereits vielfach beschrieben (Mancini und Toker, 2009). Im humanen Pankreaskarzinom konnte eine massive Überexpression von NFATc1 aufgezeigt werden. Darüberhinaus wurde ein proliferationsfördernder Einfluss von NFATc1 in Kooperation mit unterschiedlichen Partnerproteinen auf Schlüssel-Zellzyklus-Regulatoren im Pankreas gefunden (Baumgart et al., 2012; Buchholz et al., 2006; Koenig et al., 2010). Wie Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, führte die Pankreas-spezifische, konstitutive Aktivität von NFATc1 im Mausmodell zu erhöhter Proliferation im Pankreasgewebe, jedoch ohne eine Initiation der Karzinogenese zu bewirken. Im Gegensatz hierzu wurde die Mutation des Onkogens Kras als wichtiger Schritt der Tumorinitiation des PDAC bestätigt (Hingorani et al., 2003; Morris et al., 2010; Ottenhof et al., 2011; Russo et al., 2009). Durch Expression von konstitutiv aktivem Kras im Pankreas transgener Mäuse konnte die Initiation der humanen Karzinogenese rekapituliert werden. Allerdings entwickelten diese Mäuse nur in wenigen Fällen ein invasives Karzinom, sodass die Notwendigkeit weiterer onkogener Veränderungen für die Tumorprogression postuliert wurde (Hingorani et al., 2003; Morris et al., 2010). Demnach sollte im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung und Wirkungsweise von konstitutiv aktivem NFATc1 unter Einfluss einer $Kras^{G12D}$ -Mutation identifiziert und charakterisiert werden. Hierzu wurde ein Mausmodell mit Pankreas-spezifischer Expression von konstitutiv aktivem NFATc1 (*c.n.NFATc1*) und konstitutiv aktivem Kras ($Kras^{G12D}$) generiert. Um eine Expression der Genkonstrukte außerhalb des Pankreasgewebes zu verhindern, wurden die $Kras^{G12D}$ -und *c.n.NFATc1*-Genkonstrukte jeweils mit einem genaufwärts befindlichen Stop-Codon versehen. Die Cre-Rekombinase, die unter den Pankreas-spezifischen Promotoren P48 und PDX1 exprimiert wurde, führte durch Exzision der Stop-Codons zur Pankreas-spezifischen Expression von $Kras^{G12D}$ und *c.n.NFATc1*. Zunächst sollte überprüft werden, ob die zu untersuchenden

Mäuse die gewünschte Kombination der Genkonstrukte (*c.n.NFATc1*; *Kras*^{G12D}; *P48/PDX1-Cre*, *Kras*^{G12D}; *P48/PDX1-Cre*) enthielten. Dazu wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR)-Analyse aus Mausschwanzbiopsien durchgeführt, welche beispielhaft in Abbildung 10 dargestellt ist. Diese Analyse führte zur Auswahl der benötigten Mäuse. Die PCR-Produkte der DNA einer *c.n.NFATc1*; *Kras*^{G12D}; *P48/PDX1-Cre*-Maus (von nun an vereinfacht als *c.n.NFATc1*; *Kras*^{G12D} bezeichnet) zeigten dementsprechend positive Banden in der *P48/PDX1-Cre*-PCR, in der *c.n.NFATc1*-PCR und in der *Kras*^{G12D}-PCR, während *Kras*^{G12D}; *P48/PDX1-Cre*- (von nun an vereinfacht als *Kras*^{G12D} bezeichnet) Mäuse positive Banden nur in der *P48/PDX1-Cre*- und in der *Kras*^{G12D}-PCR aufwiesen.

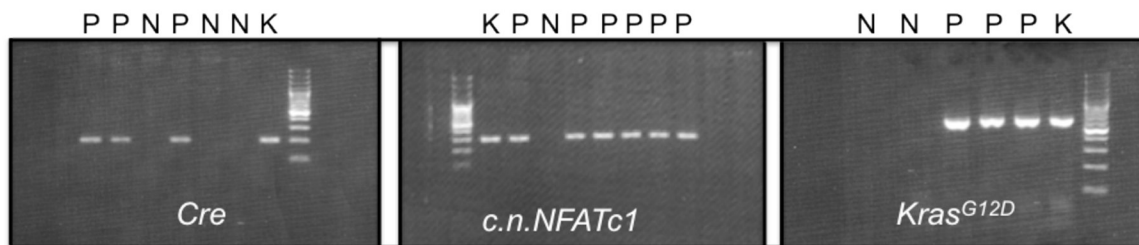


Abbildung 10: PCR-Analyse zum Nachweis der Gene *P48/PDX1-Cre*, *c.n.NFATc1* und *Kras*^{G12D}.

Nach Entnahme der Mausschwanzbiopsien und der DNA-Isolation wurden das Vorliegen der beschriebenen Gene durch eine Primer-spezifische Amplifikation und anschließende gelelektrophoretische Auftrennung nachgewiesen (P: positiv, N: negativ, K: Positiv-Kontrolle).

Positive Banden auf Höhe der Positivkontrolle bestätigten das Vorhandensein der entsprechenden Gene in der Maus und erlaubten die Auswahl der entsprechenden *c.n.NFATc1*; *Kras*^{G12D}- und *Kras*^{G12D}-Mäuse für weitere Analysen. Um die Proteinexpression des *c.n.NFATc1*-Genkonstruktes in den Mauslinien nachzuweisen, wurde eine Western-Blot Analyse von Proben aus den Pankreasgeweben durchgeführt. Der Nachweis der exogenen *c.n.NFATc1*-Proteine erfolgte indirekt über Antikörper gegen Hämagglutinin-A (HA), welches an das *c.n.NFATc1*-Genkonstrukt gekoppelt war (Abbildung 11). Hierzu wurde

das HA-Epitop durch einen spezifischen Antikörper markiert, sodass die Expression von *c.n.NFATc1* in *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäusen nachgewiesen wurde. In P48-Cre und *Kras^{G12D}* exprimierenden Mäusen konnte hingegen, wie erwartet, kein HA detektiert werden.

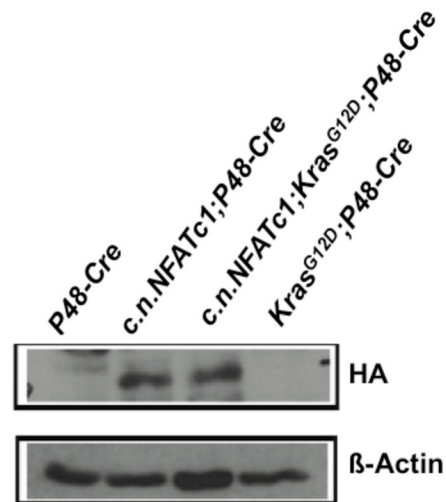


Abbildung 11: *C.n.NFATc1*- Expression im Pankreas von *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre*- und *c.n.NFATc1;P48-Cre*-Mäusen.

Aus Pankreata 2 Wochen alter Mäuse wurden Proteine isoliert, welche nach gelelektrophoretischer Auftrennung in Western Blot Analysen auf HA-Expression getestet wurden. β -Actin diente als Ladekontrolle.

3.2 *C.n.NFATc1* akzeleriert die *Kras^{G12D}*-abhängige Pankreaskarzinogenese

3.2.1 Makroskopische Analysen

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas präsentiert sich in frühen Stadien meist klinisch inapparent. Der fortschreitende Tumor verdrängt und infiltriert die Nachbarorgane und bildet Fernmetastasen. Im klinischen Verlauf kann häufig eine gefüllte, elastische Gallenblase und ein Aszites mit Zunahme des Bauchumfanges festgestellt werden (Fernandez-del Castillo, 2011).

Passend zur Situation im Menschen, wiesen *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*- Mäuse verglichen mit gleichaltrigen *Kras^{G12D}*- Mäusen teilweise schon ab einem Alter von zwei Wochen ein stark vergrößertes Abdomen auf (Abbildung 12).

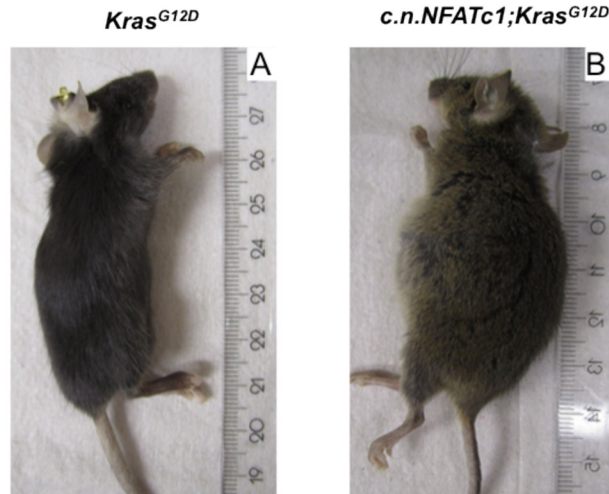


Abbildung 12: Repräsentative Profildarstellung einer *Kras^{G12D}*;P48-Cre Maus (A) und einer *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*;P48-Cre Maus (B).

Nach Tötung der Mäuse wurde ein Foto des Körperprofils erstellt. Die Fotos sind repräsentativ für die untersuchten Mäuse.

Die daraufhin durchgeführten Autopsien deuteten auf eine beschleunigte Karzinogenese der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäuse hin.

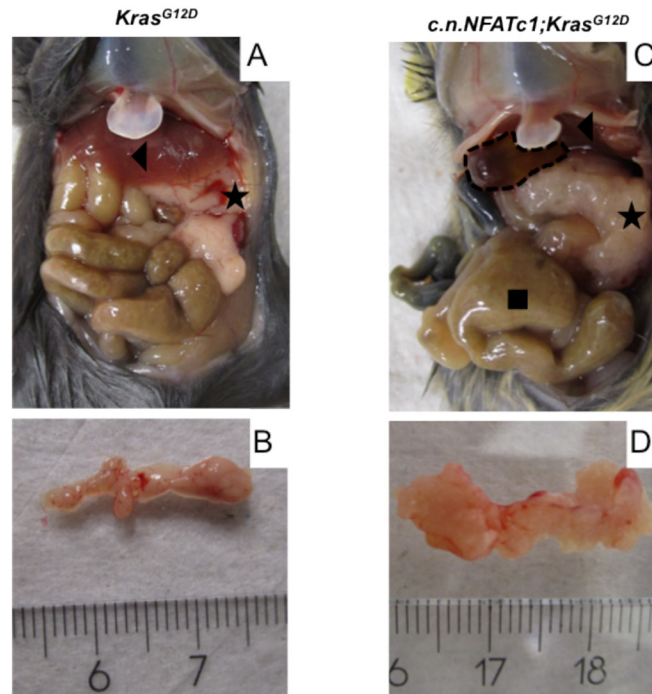


Abbildung 13: Eröffneter Bauchsitus und Pankreas einer $Kras^{G12D};P48-Cre$ Maus und $c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre$ Maus im Alter von vier Wochen.

Die Autopsie zeigte bei der $Kras^{G12D}$ -Maus (A,B) ein leicht vergrößertes Pankreas (Sternchen in Abb. A und B) ohne pathologische Affektionen der Nachbarorgane Leber (Dreieck), Milz oder Dünndarm. Im Gegensatz hierzu wies die $c.n.NFATc1;Kras^{G12D}$ -Maus (C,D) ein stark vergrößertes, derbes Pankreas (Sternchen in Abb. C und D) auf, die Milz war durch den großen Tumor größtenteils verdeckt, die Leber (Dreieck) nach kranial verlagert, die Gallenblase vergrößert (gestrichelte Linie) und der Dünndarm in einem Abschnitt stark dilatiert (Quadrat).

Pankreata von $c.n.NFATc1;Kras^{G12D}$ -Mäusen waren bereits ab einem Alter von vier Wochen stark vergrößert, derb und zystisch verändert, während $Kras^{G12D}$ -Mäuse bis zu einem Alter von ca. 12 Wochen zwar leicht vergrößerte, aber palpatorisch und morphologisch unauffällige Pankreata aufwiesen (Abbildung 13, unten). Auch nach einem Beobachtungszeitraum von einem Jahr konnten analog zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen keine Tumoren in Pankreata von $Kras^{G12D}$ -Mäusen detektiert werden. Die starke Größenzunahme der $c.n.NFATc1;Kras^{G12D}$ -Pankreata führte zur Kompression und Verlegung der Nachbarorgane. Dadurch kam es zu den in den Autopsien beobachteten dilatierten Darmschlingen und prall-gefüllten Gallenblasen. Im Gegensatz hierzu zeigten sich Nachbarorgane von Pankreata aus $Kras^{G12D}$ -Mäusen unverändert (Abbildung 13, oben).

Als Hinweise für eine mit dem Alter zunehmende Malignität imponierte dabei neben einem größenprogredienten Pankreastumor ein teils massiver, in der Autopsie nachgewiesener Aszites, mit der Folge eines stark aufgetriebenen Abdomens ab einem Alter der Mäuse von ca. 12 Wochen. Als weiteren starken Hinweis progredienter Malignität wiesen 100% der untersuchten *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäuse ab einem Alter von sieben Monaten makroskopisch sichtbare und histologisch bestätigte Lebermetastasen auf (repräsentativ in Abbildung 14, Sternchen).

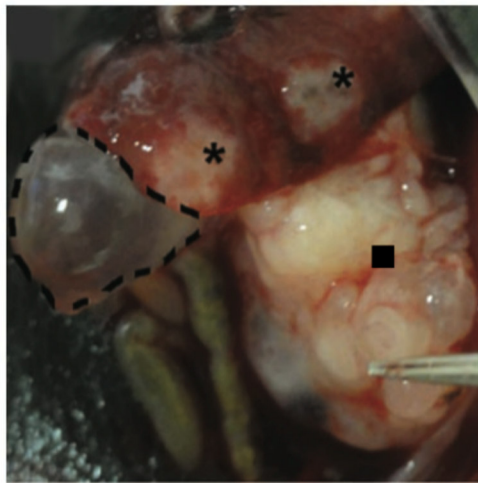


Abbildung 14: Eröffneter Bauchsitus einer repräsentativen *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* Maus im Alter von sieben Monaten.

In der Übersicht des Bauchsitus zeigten sich zwei makroskopisch erkennbare Lebermetastasen (Sternchen), eine vergrößerte, prall gefüllte Gallenblase (gestrichelte Linie) und ein massiv vergrößertes, tumorös verändertes Pankreas (Quadrat).

Die hohe Malignität der Tumoren war durch eine signifikant niedrigere Überlebensrate der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäuse im Vergleich zu *Kras^{G12D}*-Mäusen gekennzeichnet, wie aus der in Abbildung 15 dargestellten Kaplan-Meier-Überlebenskurve ersichtlich wird.

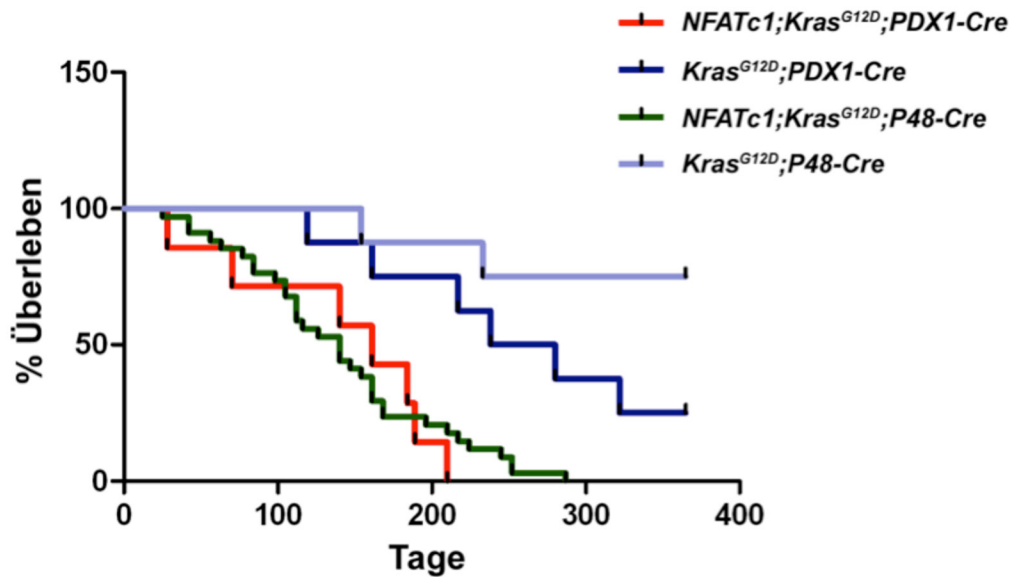


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};PDX1/P48-Cre*-Mäuse und der *Kras^{G12D};PDX1/P48-Cre*-Kontrollmäuse.

Ausgewählte *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre*-Mäuse (grün, n=34) *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};PDX1-Cre* Mäuse (rot, n=7), *Kras^{G12D};P48-Cre*-Mäuse (lila, n=8) und *Kras^{G12D};PDX1-Cre*-Mäuse (blau, n=8) wurden in einem Zeitraum von bis zu 370 Tagen beobachtet. Das Todesalter der Mäuse wurde protokolliert und in einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve aufgetragen.

Hierbei wurde eine definierte Anzahl an Mäusen zu Beobachtungszwecken täglich auf ihren Gesundheitszustand begutachtet. So waren ein stark vergrößerter Bauchumfang bei gleichzeitiger Kachexie und nur noch eingeschränkter Bewegungsfähigkeit innerhalb des Käfigs, als Ausdruck des bevorstehenden Todes, Anlass eine Notopferung durchzuführen. Diese Beobachtungen ergaben ein medianes Überleben von 140 Tagen für *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}-P48-Cre*-Mäuse (n=34) und von 161 Tagen für *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}-PDX1-Cre*-Mäuse (n=7), während *Kras^{G12D};PDX1-Cre*-Mäuse mit 259 Tagen und *Kras^{G12D};P48-Cre*-Mäuse deutlich länger lebten.

Insgesamt wiesen diese Untersuchungen darauf hin, dass *c.n.NFATc1* die *Kras^{G12D}*-abhängige Pankreaskarzinogenese durch die Entstehung hochmaligner Tumoren akzeleriert. Der bedeutsame Effekt von *c.n.NFATc1* wird hierbei vor allem durch die massiv verkürzte Überlebensdauer der betroffenen Mäuse verdeutlicht.

3.2.2 Die *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-abhängige Karzinogenese durchläuft die Schritte des Progressionsmodells

Nachfolgend sollten *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Tumoren eingehend charakterisiert werden. Die histologischen Auswertungen der Pankreasgewebeschnitte enthüllten eine schrittweise Karzinogenese der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäuse analog zu dem gängigen Progressionsmodell über Vorstufen, welche histologisch detektiert werden können. Hierbei handelt es sich um sogenannte PanIN-Läsionen, welche nach Grad der Dysplasie in PanIN1A,1B, 2 und 3 Läsionen aufgeteilt werden (Hruban et al., 2004; Shi et al., 2009).

Zur histologischen Untersuchung der Pankreata und der Lebern wurden diese Organe in Paraffin eingebettet. Dies erlaubte die Erstellung von Gewebeschnitten in einer Dicke von 4 µm, welche anschließend durch verschiedene Färbemethoden weiter bearbeitet wurden. Die Diagnosestellung und das Grading der Gewebeschnitte erfolgte freundlicherweise durch Frau Prof. Dr. Irene Esposito, Institut für Pathologie der Technischen Universität München.

Im Einklang mit dem Verlauf der humanen Karzinogenese des PDAC konnten in Pankreata von *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäusen ab einem Alter von vier Wochen sowohl azinär-duktales Metaplasien (ADM) und niedriggradige PanIN1 Läsionen als auch höhergradige PanIN2-3 Läsionen gefunden werden (repräsentativ in Abbildung 16). Eine physiologische Gewebestruktur der Pankreata mit Darstellung intakter Azini ließ sich zwar in *Kras^{G12D}*-Mäuse nachweisen, nicht aber in Pankreata von *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäusen im Alter von zwei Wochen.

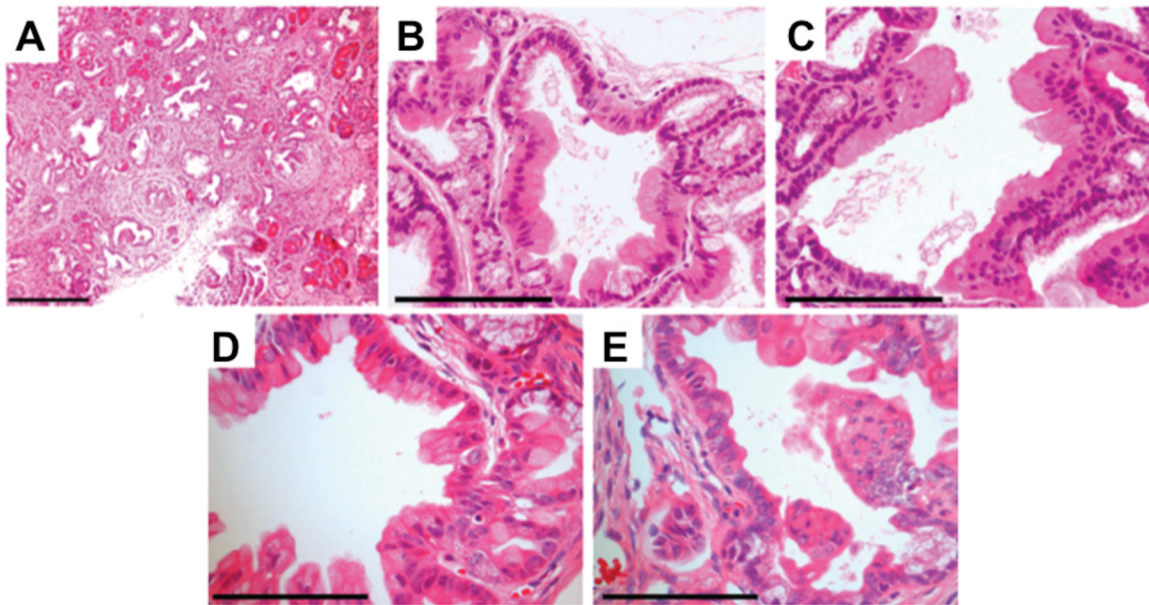


Abbildung 16: Verschiedene Dysplasiestufen in Gewebeschnitten von *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};PDX1/P48-Cre* Mäusen.

H.E.-Färbungen von Pankreasgewebeschnitten. *C.n.NFATc1;Kras^{G12D};PDX1/P48-Cre* Pankreasgewebeschnitte zeigten die Dysplasiestufen ADM (A), PanIN1A (B), PanIN1B (C), PanIN2 (D) und PanIN3 (E). Die Maßstabsskala entspricht in A 200 µm und in B-E 100 µm.

Auch in *Kras^{G12D}*-Mäusen lässt sich das gesamte Spektrum der prämaligen Vorläuferläsionen erkennen. Diese traten jedoch gegenüber den *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäusen stark verzögert auf. So wiesen *Kras^{G12D}*-Mäuse erst ab einem Alter von ca. zwölf Wochen frühe PanIN1-Vorläuferläsionen auf (repräsentativ in Abbildung 17). Höhergradige PanIN3 Läsionen imponierten allerdings erst ab einem Alter von ca. 52 Wochen (Hingorani et al., 2003). Besonders der in Abbildung 17 dargestellte Vergleich von *Kras^{G12D}*- und *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Pankreasgewebeschnitten verdeutlicht die massive Akzeleration der *Kras^{G12D}*-abhängigen Karzinogenese durch *c.n.NFATc1*.

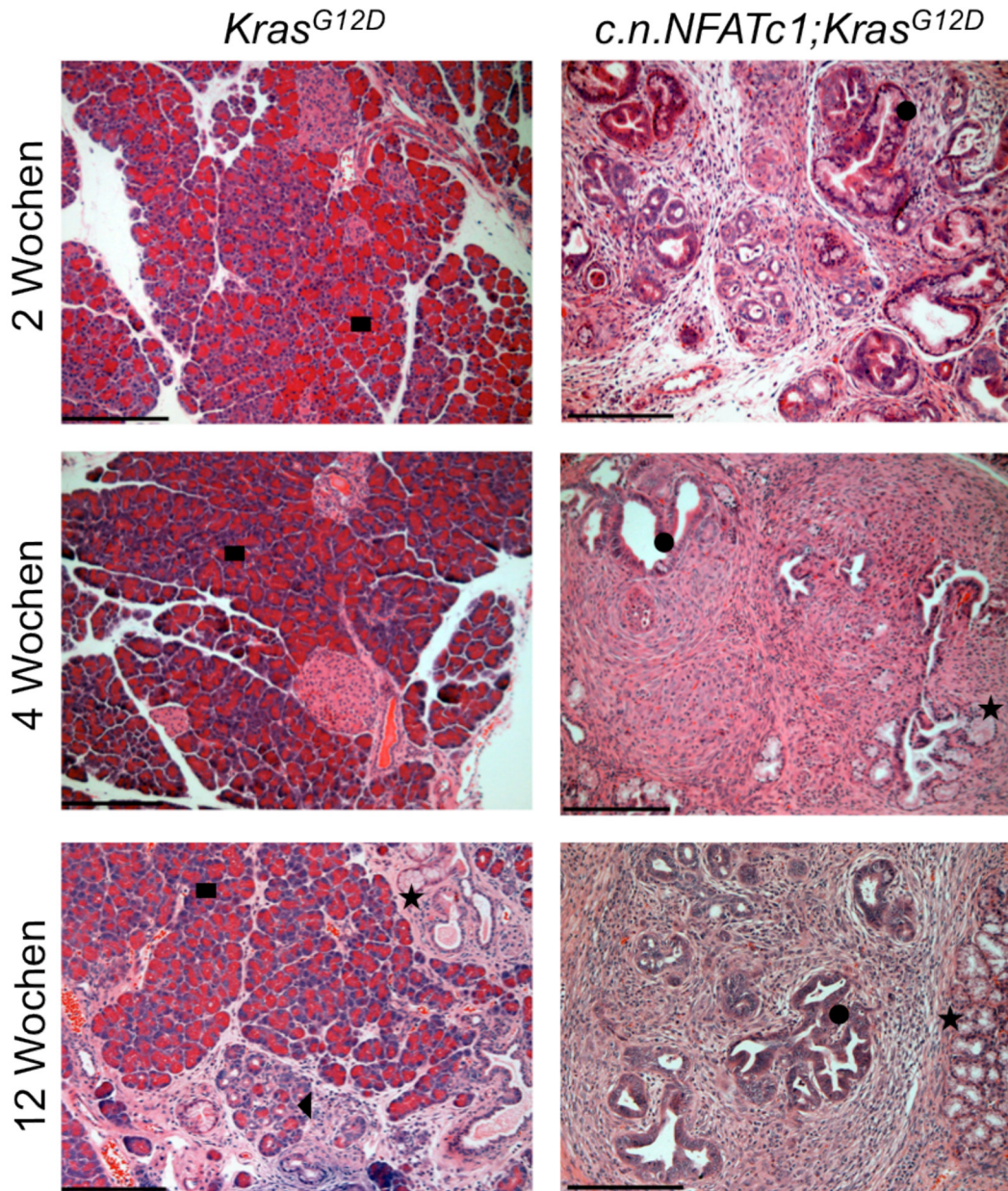


Abbildung 17: Vergleich von $Kras^{G12D};P48-Cre$ und $c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre$ Mäusen verschiedener Altersstufen.

Im $Kras^{G12D}$ -Pankreasgewebe präsentierten sich PanIN1-Läsionen (Sternchen), ADM (Dreieck) und morphologisch unauffällige Azini (Quadrat). In $c.n.NFATc1;Kras^{G12D}$ -Pankreata waren ebenfalls ADM (Dreieck), PanIN1-Läsionen (Sternchen) und höhergradige PanIN-Läsionen/PDAC-Foci (Punkt) ohne intakte Azinusstrukturen zu finden. Die Maßstabsskala entspricht 200 μm .

So entwickelten $c.n.NFATc1;Kras^{G12D}$ -Mäuse verglichen mit $Kras^{G12D}$ -Mäusen nicht nur deutlich früher höhergradige PanIN3-Läsionen, vielmehr konnte bei

diesen Mäusen die frühe Ausbildung eines manifesten Pankreaskarzinoms beobachtet werden (repräsentativ auf Abbildung 18 A und B).

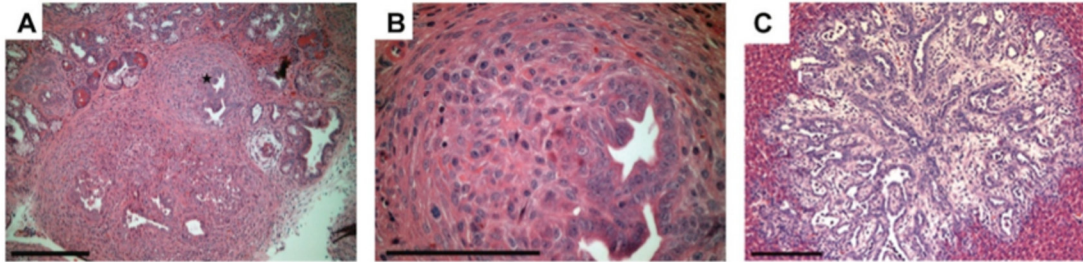


Abbildung 18: Focus eines duktalen Adenokarzinoms (A,B) des Pankreas und einer Lebermetastase (C) einer *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* Maus.

Pankreasgewebeschnitte einer *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* Maus im Alter von vier Wochen wurden in H.E. gefärbt. (A) und (B) Repräsentative Übersicht eines *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* Pankreasgewebes mit invasivem duktalen G2-Karzinom. (C) Lebermetastase einer *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* Maus im Alter von sieben Monaten. Im Außenbereich der Abbildung ist Lebergewebe zu erkennen. Das Zentrum der Abbildung wird durch die Lebermetastase gebildet, welche als G2-Grad PDAC-Metastase diagnostiziert wurde. Die Skalierung entspricht in (A) 200 μm , in (B) und (C) 100 μm .

Bereits ab einem Alter von vier Wochen konnte die Ausbildung von Pankreastumoren beobachtet werden. Bei 36-Wochen alten *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäusen konnte schließlich eine 100%ige Tumorinzidenz festgestellt werden, während *Kras^{G12D}*-Mäuse keine Tumoren in diesem Zeitraum entwickelten (Abbildung 19).

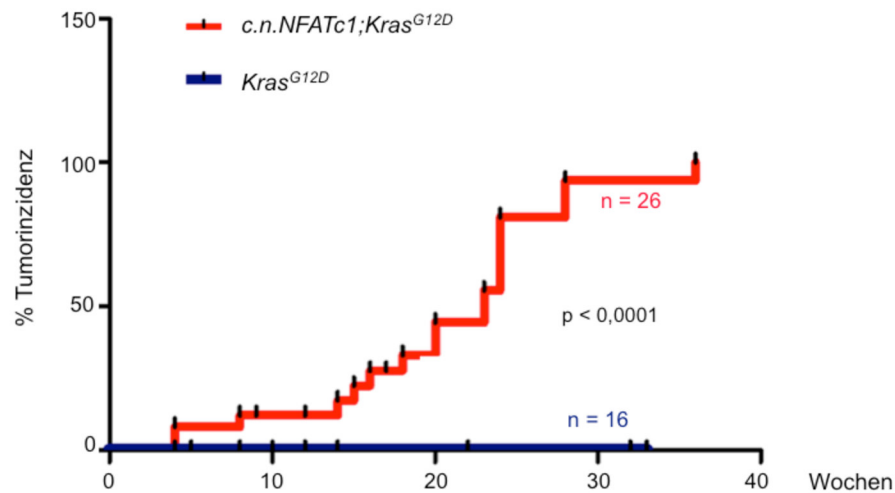


Abbildung 19: Inzidenz histologisch gesicherter duktaler Adenokarzinome des Pankreas von *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* und der *Kras^{G12D};P48-Cre* Mäusen in Abhängigkeit vom Alter.

Die Pankreata aller geopferten *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre*- und der *Kras^{G12D};P48-Cre*- Mäuse wurden histologisch auf das Vorliegen eines PDAC untersucht.

Ein typisches Phänomen des fortgeschrittenen humanen PDAC besteht in seiner Tendenz zur Metastasierung, welche an erster Stelle die Leber betrifft (Fernandez-del Castillo, 2011). Daher wurden Lebern der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäuse makroskopisch untersucht und bei Auffälligkeit entnommen und der Histologie zugeführt. So konnte festgestellt werden, dass 100% der untersuchten *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäuse ab einem Alter von sieben Monaten histologisch gesicherte Lebermetastasen aufwiesen (repräsentativ in Abbildung 18C).

Insgesamt wird demnach deutlich, dass sowohl Pankreata der *Kras^{G12D}*-Mäuse als auch der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäuse alle prämaligen Vorstufen der Karzinogenese des PDAC aufwiesen. Die Entwicklung dieser war jedoch bei *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*- Mäusen signifikant beschleunigt.

3.2.3 Proliferationsindex, Grading und Expression der Cyclooxygenase-2 zeigen eine hohe Malignität des PDAC der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäuse

Die Malignität eines Tumors bestimmt maßgeblich dessen Prognose. Bei einer 5-Jahres-Überlebensrate von 5-7 % bei Männern und 3-8 % bei Frauen in Deutschland zählt das humane PDAC zu den Karzinomen mit der schlechtesten

Prognose (Husmann et al., 2010). Diese kann anhand einer Vielzahl von Kriterien ermittelt werden. Zu diesen Kriterien gehören neben der Tumorausdehnung und der Metastasierung auch histopathologische und immunhistopathologische Kriterien wie das Grading des Tumors, seine Proliferationstätigkeit und die Menge des exprimierten, pro-inflammatorischen Proteins Cyclooxygenase (COX)-2.

Proliferation ist dabei eine entscheidende Eigenschaft eines Malignoms und seiner Vorstufen. Sie ist die Voraussetzung für eine weitere Ausdehnung des Malignomgewebes und daher ein Maß für die Tumoraktivität und äußert sich unter anderem durch die Expression des Proteins Ki67 (Scholzen und Gerdes, 2000). Ki67 wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus, also in den Phasen G₁, S, G₂ und M, im Nucleus exprimiert, während es in der G₀-Phase nicht detektiert werden kann (Gerdes et al., 1984).

Sowohl in *Kras*^{G12D}-Mauspankreatata als auch in *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D}-Mauspankreatata wurde immunhistologisch eine deutliche nukleäre Expression von Ki67, besonders in PanIN2 und PanIN3 Läsionen, detektiert (repräsentativ in Abbildung 20 A). Im Gewebe der *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D}-Mauspankreatata proliferierten jedoch besonders die karzinomatös veränderten Areale inklusive der umliegenden Stromazellen. Zum direkten Vergleich des Proliferationsindex beider Genotypen wurden Gewebeschnitte mit Ki67-spezifischen Antikörpern gefärbt und die positiven Kerne ausgezählt. Hierbei konnte ein mit 17% gegenüber 5% signifikant erhöhter Proliferationsindex der *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D}-Mauspankreatata bestätigt werden und bekräftigte so die zuvor beobachtete Beschleunigung des Tumorwachstums durch *c.n.NFATc1* (Abbildung 20 B).

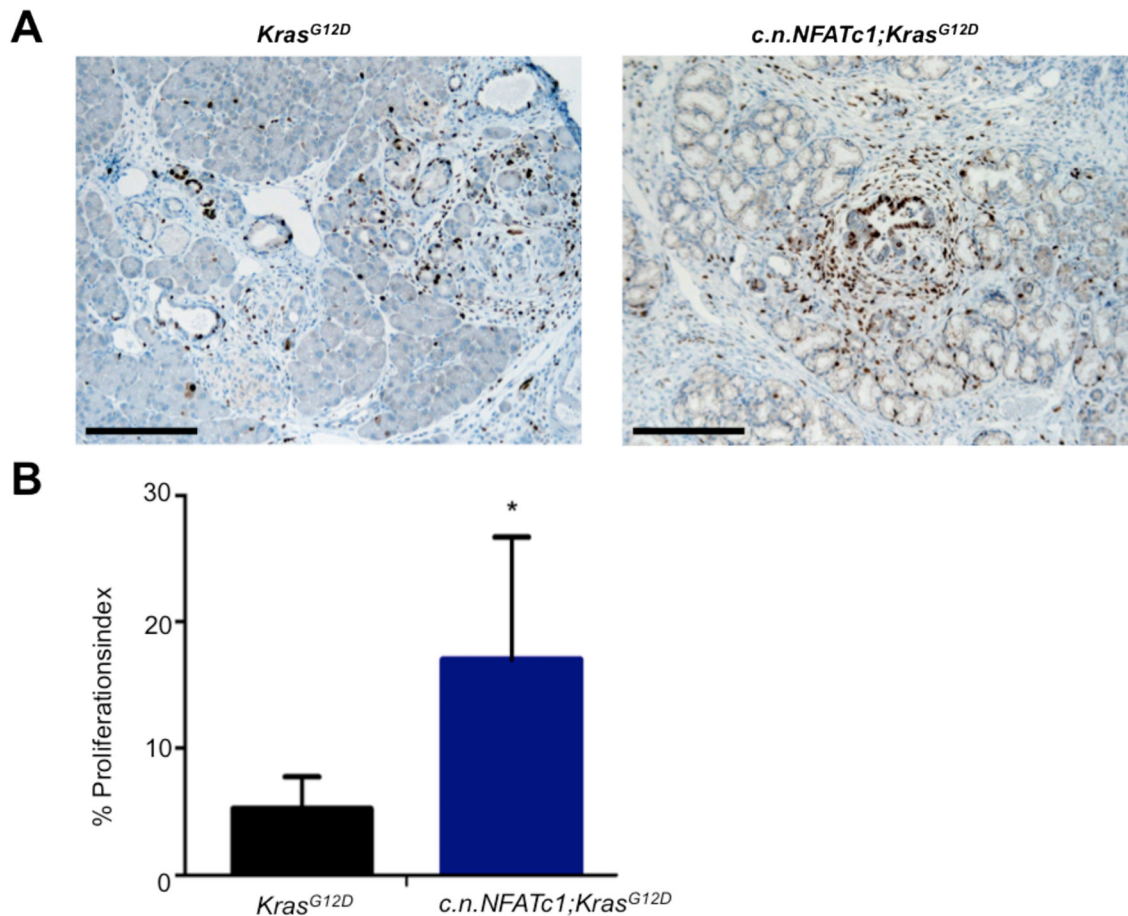


Abbildung 20: Proliferation des Pankreasgewebes von *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}* und *Kras^{G12D}*-Mäusen.

(A) Pankreasgewebeschnitte von *Kras^{G12D};P48-Cre* (links) und *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* (rechts) Mäusen wurden mit einem Antikörper gegen das Protein Ki67 inkubiert. Anschließend erfolgte die Visualisierung durch DAB und Gegenfärbung mit Hämalaun. Die Maßstabsskalen entsprechen 200 μ m. (B) Ermittelter Proliferationsindex von *Kras^{G12D};P48-Cre* und *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* Mäusen. Dieser wurde ermittelt, indem die Ki67 positiven Kerne von je 20 metaplastische Läsionen im Verhältnis zu den Ki67 negativen Kernen aus jeweils 3 Mäusen ausgezählt wurden. Die Daten zeigen die Durchschnittswerte in Prozent \pm Standardabweichung, $p < 0,05$.

Die hohe Malignität eines Tumors geht nicht nur mit einer Beschleunigung des Tumorwachstums einher, sondern auch mit der Tendenz zur Entdifferenzierung der Tumorzellen. So führt ein gut differenzierter Tumor (G1) in der Regel zu einer besseren Prognose, als ein schlecht differenzierter (G3) Tumor. Einhergehend mit der hohen Letalität des humanen PDAC, werden diese überwiegend als mäßig (G2) bis schlecht (G3) differenzierte Tumoren eingestuft (Longnecker, 2011). Passend dazu wurden auch die untersuchten Karzinome der

c.n.NFATc1;Kras^{G12D}-Mäuse in der Mehrzahl der Fälle als G2-G3 Tumoren eingeteilt (siehe Abbildung 21 A). 50% aller untersuchten Pankreata der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäuse wiesen mäßig differenzierte tubuläre Drüsen mit irregulärer Schleimproduktion, eine mäßig erhöhte Mitosedichte und moderate nukleäre Pleomorphismen auf und entsprachen damit dem WHO-Grad 2 (repräsentativ in Abbildung 21 B). Weitere 31,5% der Tumoren wurden als G3-Tumoren, also hoch-maligne, schlecht differenzierte Tumoren ohne Schleimproduktion mit einer stark erhöhten Mitosedichte und nukleären Pleomorphismen, diagnostiziert (repräsentativ in Abbildung 21 B). Anaplastische bzw. sarkomatoide Tumoren und somit ein fast vollständiger Verlust jeglicher Differenzierung der Tumorzellen, ebenso wie gut differenzierte G1-Tumoren, zählten, wie auch bei humanen PDAC, zur Minderheit der detektierten Tumoren der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäuse (siehe Abbildung 21 A).

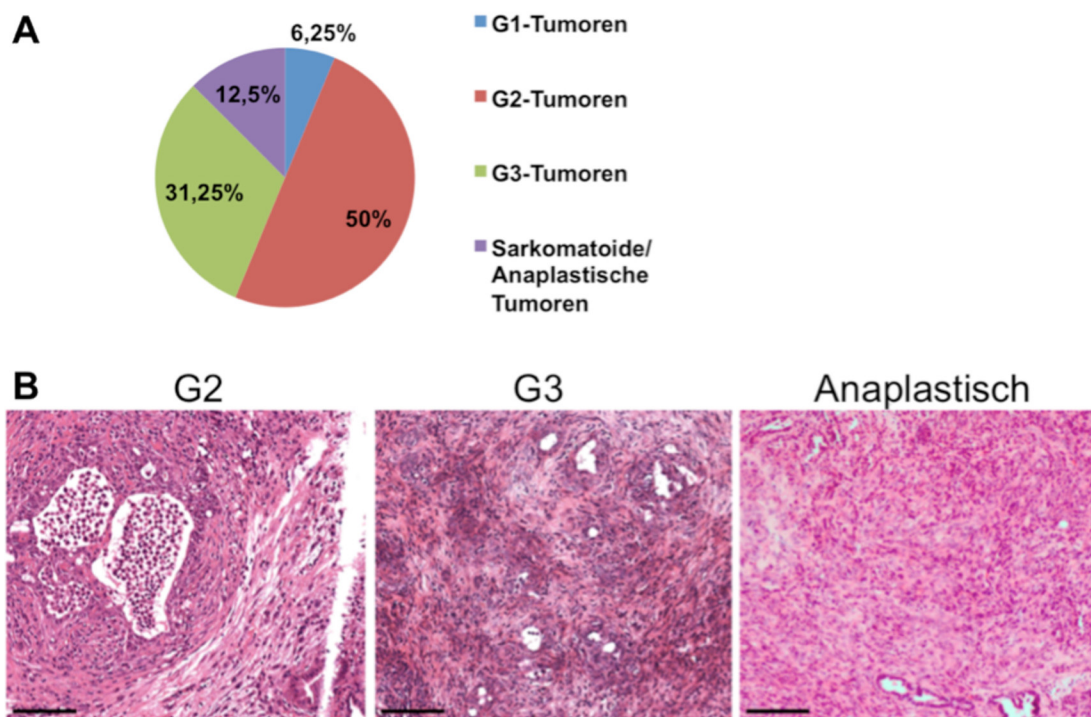


Abbildung 21: Grading der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* Mäuse.

(A) Die Pankreata der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* Mäuse (n=16) wurden in H.E. gefärbt und anschließend nach dem WHO Schema in G1- (gut differenzierte) Tumoren, über G2- und G3- bis hin zu undifferenzierten anaplastischen und sarkomatoiden Tumoren eingeteilt. (B) Repräsentative Darstellung von Tumoren der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* Mäuse der Grade G2, G3 und anaplastisch. Die Maßstabsskalen entsprechen 100 µm.

Die Prognose eines humanen Pankreaskarzinoms kann zusätzlich über die Expression des pro-inflammatorischen Cyclooxygenase (COX)-2-Gens eingeschätzt werden. Hierbei verschlechtert sich die Prognose bei einer Zunahme der COX-2 Expression (Matsubayashi et al., 2007). Eine Überexpression des pro-inflammatorischen Enzyms COX-2 wurde in humanen prämaligen Vorläuferläsionen und im humanen PDAC gefunden (Maitra et al., 2002; Schlosser et al., 2002). Passend dazu präsentierte sich in immunhistochemischen Färbungen eine Überexpression des Enzyms COX-2 in dysplastischen Arealen von sowohl *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*- als auch *Kras^{G12D}*-Pankreata, hier jedoch in deutlich geringerem Ausmaß (repräsentativ in Abbildung 22) (Hingorani et al., 2003). Die verstärkte COX-2 Expression in *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mauspankreatata imponierte nicht nur in prämaligen Vorläuferläsionen, sondern besonders auch in Karzinomzellen (repräsentativ in Abbildung 22, rechts). In histologisch unauffälligem Gewebe jedoch wurde COX-2 lediglich in einigen Endothelzellen exprimiert.

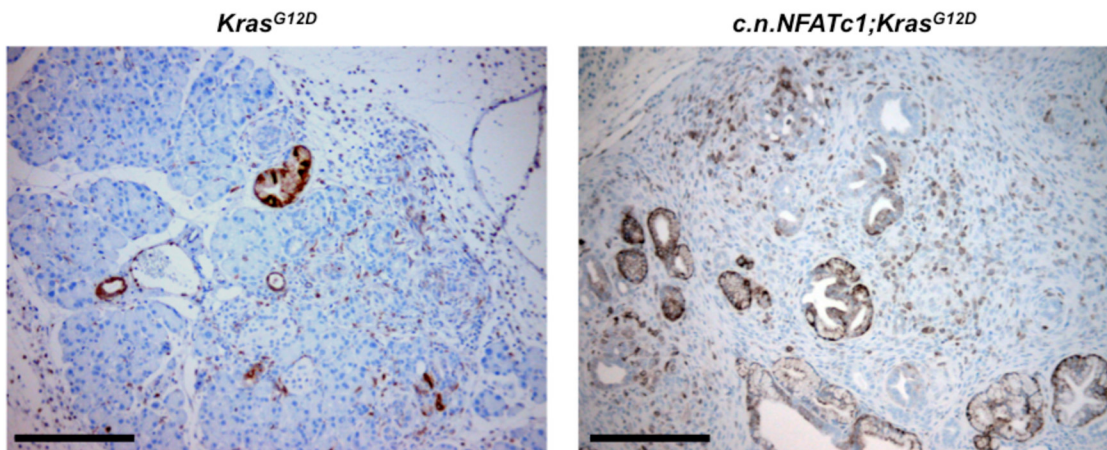


Abbildung 22: Expression der Cyclooxygenase-2 in dysplastischen Arealen von *Kras^{G12D};P48-Cre* und *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* Mäusen.

Pankreasgewebeschnitte von Pankreata von *Kras^{G12D}*- (links) und *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäusen (rechts) wurden mit COX-2 Antikörpern inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit DAB, im Anschluss wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Links: COX-2 positive PanIN1-Läsion und ein COX-2 positives Areal einer ADM. Rechts: Überexpression von COX-2 in der Mehrheit der dysplastischen Areale sowie in Karzinomzellen. Die Skalierung entspricht 200 µm.

Diese Daten zeigen schließlich, dass die zusätzliche Aktivierung von *c.n.NFATc1* im Pankreas die COX-2 Expression vor allem in dysplastischen Arealen maßgeblich stimuliert.

Zusammenfassend konnte die hohe Malignität der Pankreasneoplasien in *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäusen in Analogie zum humanen PDAC durch einen signifikant erhöhten Proliferationsindex, die Einteilung als überwiegend mäßig bis schlecht differenzierte Karzinome und eine erhöhte Expression von COX-2 untermauert werden.

3.3 Azinär-duktales Metaplasien als Ausgangspunkt der Karzinogenese

3.3.1 *C.n.NFATc1* wird während der gesamten Karzinogenese exprimiert

Bisher konnten die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die zusätzliche Expression von konstitutiv nukleärem NFATc1 die Entstehung von PanIN-Läsionen und PDACs im *Kras* transgenen Mausmodell massiv beschleunigt. Der Ursprung der PanIN-Zellen ist noch unklar, jedoch gibt es zahlreiche Hinweise für azinäre Zellen als Ursprungszellen (Miyamoto et al., 2003; Zhu et al., 2007).

Da das NFATc1-Konstrukt in den transgenen Mäusen mit einem Hämagglutinin-A (HA)-tag markiert war, konnte die Expression von NFATc1 während der Karzinogenese verfolgt werden und damit unter anderem Hinweise für die Karzinom-initiierenden Zellen geben.

Die Lokalisierung der *c.n.NFATc1*-exprimierenden Areale innerhalb des Pankreasgewebes erfolgte indirekt über Antikörper gegen HA, welches an das *c.n.NFATc1*-Genkonstrukt gekoppelt war. Hierzu wurde das HA-Epitop durch einen spezifischen Antikörper immunhistochemisch markiert und anschließend angefärbt. In *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mauspankreatata konnte die nukleäre Expression des Genkonstruktes *c.n.NFATc1* sowohl in unauffälligen Azinuszellen als auch in PanIN-Läsionen aufgezeigt werden (repräsentativ in Abbildung 23 A-D). Im umgebenden Stroma hingegen konnte keine HA-Expression nachgewiesen werden. Darüber hinaus wiesen sowohl Karzinomzellen als auch

Lebermetastasen eine deutlich erhöhte Expression von *c.n.NFATc1* auf (repräsentativ in Abbildung 23 C-D).

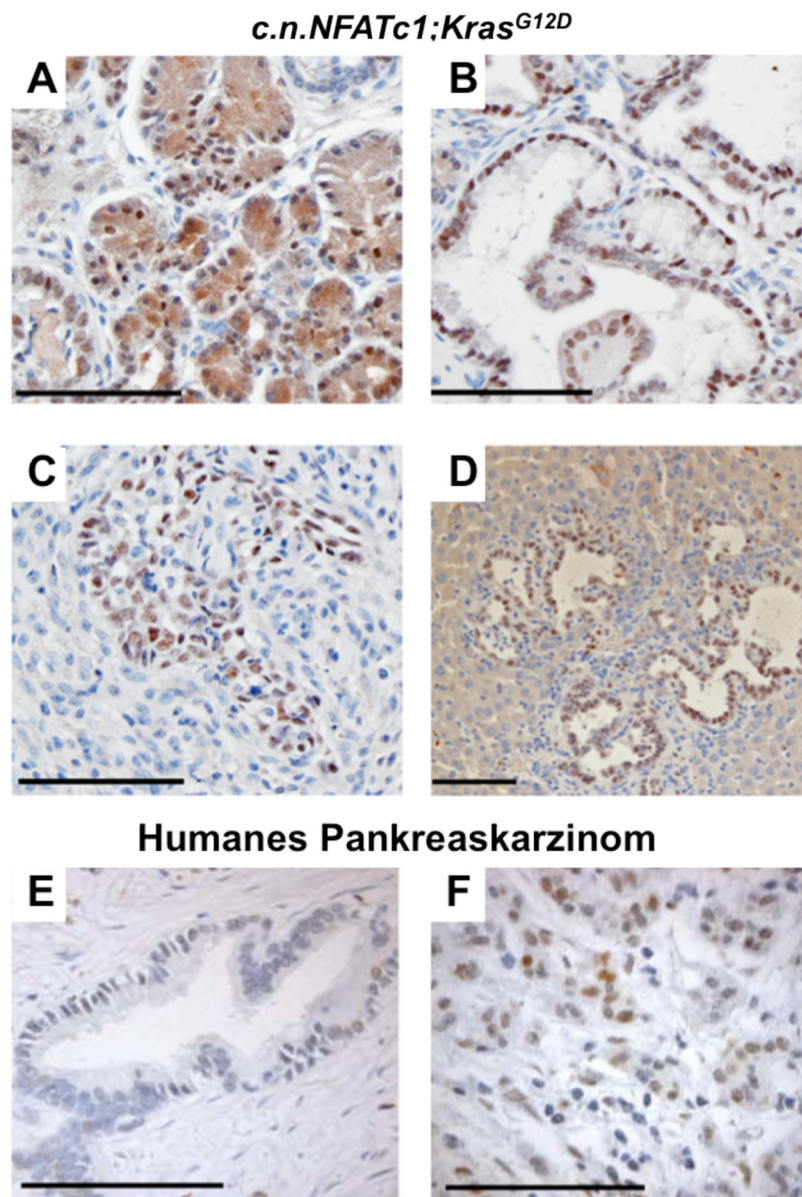


Abbildung 23: NFATc1-Expression in Gewebe von *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* Mäusen und in humanem Pankreasgewebe.

Die immunhistochemische Färbung von HA-gekoppeltem *c.n.NFATc1* zeigt dessen Expression in Azini (A) und in PanIN1-Läsionen (B) einer 4 Wochen alten *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre*-Maus sowie in einem invasiven PDAC (C) und in einer Lebermetastase (D) einer *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Maus im Alter von sieben Monaten. NFATc1 wird in humanem Pankreasgewebe in PanINs (E) und im Karzinomgewebe (F) exprimiert. Die Maßstabsskala entspricht 100 µm.

Damit zeigte sich, wie in Abbildung 23 dargestellt, eine Expression von NFATc1 in Vorläuferläsionen und in Pankreaskarzinomzellen sowohl von

c.n.NFATc1;Kras^{G12D}-Mauspankreatata als auch in humanem Pankreaskarzinomgewebe, sodass eine Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus dem *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mausmodell auf die humane Pankreaskarzinogenese unterstützt werden kann.

Die Expression von *c.n.NFATc1* präsentierte sich bereits in histologisch unauffälligen Azini und blieb über die Entwicklung der Dysplasien bis hin zum invasiven Karzinom und in Metastasen, also während des gesamten Prozesses der Karzinogenese, bestehen. Somit weisen diese Daten daraufhin, dass sich die Karzinomzellen im *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mausmodell höchst wahrscheinlich aus *c.n.NFATc1* exprimierenden azinären Zellen über die azinär-duktaile Metaplasie und prämaligne Vorläuferläsionen entwickelten.

3.3.2 Die PanIN-Zellen zeigen azinäre Eigenschaften

Die Entstehung der PanIN-Läsionen über die azinär-duktaile Metaplasie wurde bereits in Untersuchungen von PanIN-Zellen im *Kras^{G12D}*-Mausmodell aufgezeigt, wobei häufig eine biphänotypische Differenzierung gefunden wurde. Die Zellen zeigten also sowohl azinäre als auch duktaile Merkmale (Zhu et al., 2007). Im *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mausmodell konnte die Expression von *c.n.NFATc1* in gesunden Azinuszellen und in PanIN1-Läsionen bis hin zu Karzinomzellen nachgewiesen werden. Daher sollte eruiert werden, welche Differenzierung die Zellen unter *c.n.NFATc1* Einfluss annehmen.

Azinäre Zellen der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mauspankreatata konnten mithilfe eines Antikörpers gegen Amylase, ein im Pankreas Azinus-spezifisches Enzym, nachgewiesen werden. Mit zunehmendem Alter der Mäuse imponierte eine Abnahme der Amylase-Expression bis hin zu einem fast vollständigen Verlust im Alter von 30 Wochen (repräsentativ in Abbildung 24). Folglich scheint im Rahmen der Tumorprogression ein Verlust der azinären Eigenschaften stattgefunden zu haben.

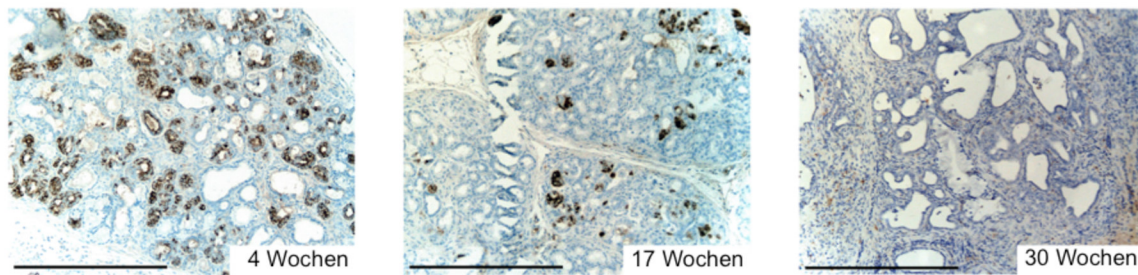


Abbildung 24: Verlust der azinären Differenzierung in *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* Mauspankreatata.

Ein Antikörper gegen Amylase wurde auf Pankreasgewebeschnitte aufgebracht. Nach der Visualisierung mithilfe von DAB wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun vorgenommen. Die Maßstabsskala entspricht 100 μ m.

Duktale Eigenschaften der PanIN-Zellen wurden mithilfe der epithelialen Marker Zytokeratin 18 und 19 untersucht. Bei Zytokeratin 18 und 19 handelt es sich um Proteine der Intermediärfilamente, welche unter anderem in allen humanen epithelialen Tumoren des Gastrointestinaltraktes gefunden werden können. Im Pankreas dienen sie als Marker für die duktale Differenzierung (Hruban und Fukushima, 2007; Lee et al., 2003; Schussler et al., 1992). Die Detektion von Zytokeratin 18 und Zytokeratin 19 mittels spezifischer Antikörper ermöglichten die Visualisierung der Verteilung der dukталen Strukturen im Pankreasgewebe.

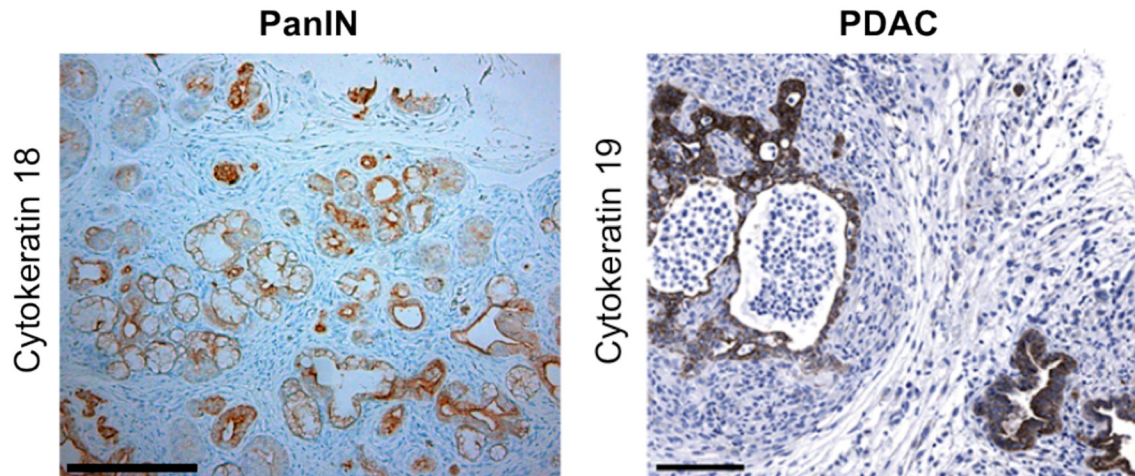


Abbildung 25: Immunhistologischer Nachweis der dukталen Differenzierung der Dysplasien und des PDAC.

Gewebeschnitte von Pankreata von *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre* Mäusen wurden mit Zytokeratin 18 oder Zytokeratin 19 Antikörpern inkubiert (Cytokeratin 19 Färbung wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Esposito zur Verfügung gestellt). Die Visualisierung erfolgte mit DAB. Im Anschluss wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Die linke Maßstabsskala entspricht 200 µm, die rechte 100 µm.

In *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäusen ließen sich Zytokeratin 18 und 19 im Zytosol von PanIN-Läsionen sowie im Zytosol von Pankreaskarzinomzellen nachweisen, wodurch das Vorliegen dukтaler Dysplasien und eines dukтalen Adenokarzinoms bestätigt wurde (repräsentativ in Abbildung 25).

PanIN Läsionen zeigten also zunächst nicht nur eine dukтale Differenzierung, sondern viele wiesen auch azinäre Merkmale auf. Hierbei kam es im Alter von sechs Monaten unter Einfluss von *c.n.NFATc1* zu einem vollständigen Verlust der azinären Eigenschaften. Daher ergaben sich starke Hinweise dafür, dass eine azinär-dukтale Transdifferenzierung nicht nur im *Kras^{G12D}*-Mausmodell, sondern auch im *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mausmodell stattfand.

3.4 Modulation onkogener Signalwege

3.4.1 Frühe Aktivierung des Notch-Signalweges und Inaktivierung von p16^{INK4A}

Die Karzinogenese vieler Tumoren, wie auch die des Pankreaskarzinoms, geht häufig mit einer Re-Aktivierung zuvor ruhender embryonaler Signalwege einher (Koorstra et al., 2008). Insbesondere der Schritt der azinär-dukтalen

Transdifferenzierung in *Kras*^{G12D}-Mäusen wird mit einer Re-Aktivierung des Notch-Signalweges assoziiert (Zhu et al., 2007).

Um eine Aktivierung des Notch-Signalweges in Pankreata von *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D}-Mäusen zu überprüfen, wurden Gewebeschnitte mit einem Antikörper gegen Hes1, einem nachgeschalteten Zielgen von Notch, inkubiert. Hierbei zeigte sich in Pankreata von *Kras*^{G12D}-Mäusen im Alter von zwei Wochen die Expression von Hes1 lediglich in einzelnen Zellen (repräsentativ in Abbildung 26, links). Alters gepaarte *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D}-Mäuse hingegen wiesen eine massive Aktivierung des Notch-Signalweges in bestehenden niedrig-gradigen PanIN-Zellen auf (repräsentativ in Abbildung 26, rechts, Sternchen).

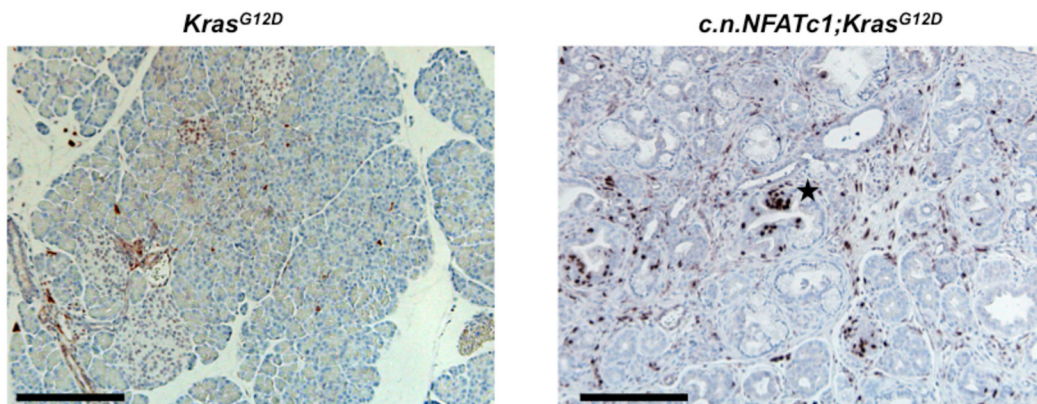


Abbildung 26: Aktivität des Notch-Signalweges in *Kras*^{G12D};*P48-Cre* und in *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D};*P48-Cre* Mäusen im Alter von zwei Wochen.

Kras^{G12D}- und *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D}- Gewebeschnitte von Mauspankrea wurden mit Hes1 Antikörpern inkubiert. Zur Visualisierung wurde DAB verwendet und eine Gegenfärbung mit Hämalan wurde angeschlossen. Sternchen: PanIN1B-Läsion mit starker Aktivität des Notch-Signalweges. Die Maßstabsskala entspricht 200 µm.

Unsere Untersuchungen deuten daher darauf hin, dass *c.n.NFATc1* viele in der *Kras*^{G12D}-abhängigen Karzinogenese auftretende Mechanismen, wie z.B. die Entstehung azinär-duktalear Metaplasien, verstärkt. Ein weiterer entscheidender Mechanismus bei der Bildung des PDAC stellt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen dar, wobei in der Genese des Pankreaskarzinoms das Silencing des Tumorsuppressorgens p16^{INK4A} eine entscheidende Rolle spielen soll (Koorstra et al., 2008). Tumorsuppressorgene haben die Aufgabe, das Zellwachstum und die Zellvermehrung auf onkogene Stimuli hin zu hemmen. P16^{INK4A} ist ein Cyclin-abhängiger-Kinase-(CDK)Inhibitor der G1 Phase des

Zellzyklus, der an CDK 4 und 6 bindet. Dadurch wird deren Bindung an Cyclin D verhindert, sodass der Komplex aus CDK 4, CDK 6 und Cyclin D nicht entstehen kann. Aufgabe dieses Komplexes ist es, das Zellzykluskontrollprotein Retinoblastoma Protein zu phosphorylieren und damit zu inaktivieren. p16^{INK4A} verhindert den Übergang von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus und wirkt auch durch die Induktion einer Seneszenz, also eines irreversiblen Wachstumsarrestes, als Tumorsuppressor (Bardeesy et al., 2006a; Michaloglou et al., 2005; Serrano et al., 1997).

In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass onkogene Stimulation durch Kras^{G12D} zu einer Induktion von p16^{INK4A} führt, wodurch die Zelle in einen permanenten Wachstumsarrest überführt wird. Dieser, als Onkogen-induzierte Seneszenz bezeichnete Vorgang, scheint ein wichtiger Schutzmechanismus einer Zelle vor maligner Transformation zu sein (Collado und Serrano, 2010; Koorstra et al., 2008). Erst die Überwindung der Seneszenz erlaubt die Transformation zu einem invasiv wachsenden Tumor. In dieser Arbeit wurde eine erhöhte Expression von p16^{INK4A} in Kras^{G12D}-Kontrollmäusen gegenüber P48-Cre-Mäusen bestätigt. Hierzu wurden Pankreasproteinisolate gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend im Western Blot mit einem Antikörper gegen p16^{INK4A} inkubiert (siehe Abbildung 27). Auffällig war jedoch, dass die Expression von p16^{INK4A} in *c.n.NFATc1* und in *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mauspankreaten supprimiert war. Dies lieferte Hinweise darauf, dass *c.n.NFATc1* zur Inaktivierung des Tumorsuppressors p16^{INK4A} führt und dadurch die Karzinogenese in Kras-mutierten Mäusen beschleunigt.

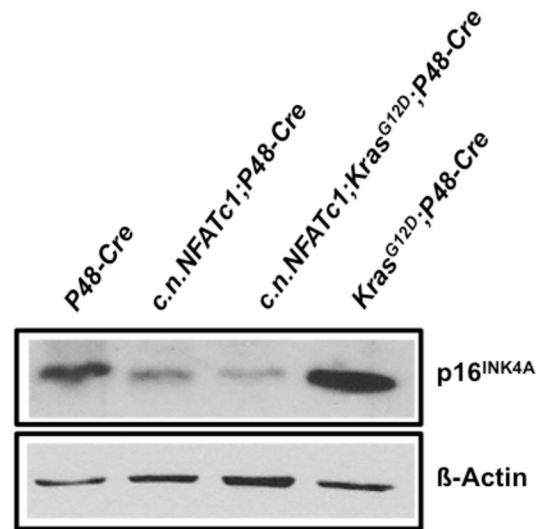


Abbildung 27: Expressionsanalyse von p16^{INK4A} in Pankreata von P48-Cre, c.n.NFATc1;P48-Cre, c.n.NFATc1;Kras^{G12D} P48-Cre und Kras^{G12D}-P48-Cre-Mäusen. Nach Entnahme der Mauspankcreata wurden die Proteinanteile isoliert und mit diesen nach gelelektrophoretischer Auftrennung ein Western Blot mit Antikörpern gegen p16^{INK4A} durchgeführt. β-Actin diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend konnte in c.n.NFATc1;Kras^{G12D}-Mäusen ein beschleunigtes Auftreten onkogener Ereignisse, der Aktivierung des Notch-Signalweges und Inaktivierung des Tumorsuppressors p16^{INK4A}, beobachtet werden.

4 Diskussion

4.1 NFATc1 akzeleriert die Kras-induzierte Pankreaskarzinogenese

Ursprünglich wurde NFATc1 als Regulator von T-Zell-Aktivierung und Differenzierung entdeckt, bevor dessen Bedeutung für die Entstehung von zahlreichen hämatologischen und soliden Malignomen erkannt wurde (Mancini und Toker, 2009; Shaw et al., 1988). Eine entscheidende Bedeutung von NFATc1 für das Wachstum und die Erhaltung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas wurde bereits mehrfach postuliert (Buchholz et al., 2006; König et al., 2010). Dabei konnte im humanen duktales Adenokarzinom des Pankreas in 69,5% der Fälle eine Überexpression von NFATc1 im Zellkern festgestellt werden. Die pro-proliferativen Effekte des NFATc1-Signalweges entstehen unter anderem durch eine Induktion von Schlüssel-Zellzyklus-Regulatoren wie z.B. c-myc (Buchholz et al., 2006) oder durch Repression essentieller Tumorsuppressorgene wie p15^{Ink4b} (Baumgart et al., 2012). Außerdem gilt NFATc1 als möglicher Mediator zwischen einer chronischen Pankreatitis und der Karzinogenese des PDAC (Baumgart et al., 2013). Diese verläuft im humanen PDAC nach dem gängigen Progressionsmodell über die sogenannte PanIN-PDAC-Linie (Hruban et al., 2000; Morris et al., 2010), welche progredient über nicht-invasive Vorläuferläsionen zum invasiven Karzinom voranschreitet.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die isolierte Wirkung von NFATc1 bereits im transgenen Mausmodell überprüft. Hierzu wurde ein verändertes NFATc1 Genkonstrukt Pankreas-spezifisch exprimiert, welches einen Austausch von 13 Serinen durch Alanin vorsah. Diese Mutation hemmte den Kernexport, sodass NFATc1 konstitutiv nukleär (c.n.NFATc1) und damit konstitutiv aktiv vorlag. Zwar konnten innerhalb eines Jahres keine PanIN-Läsionen oder PDACs nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich eine im Vergleich zu Cre-Kontrollmäusen signifikant erhöhte Proliferationsrate im Pankreasgewebe. Mäuse im Alter von mehr als sechs Monaten wiesen außerdem erhöhte Apoptoseraten und eine zunehmende Atrophie auf, wobei hier vermutlich die Onkogen-induzierte Apoptose einen entscheidenden Mechanismus bei der

Verhinderung des Progresses der Karzinogenese darstellte (unveröffentlichte Daten der AG Ellenrieder). Somit zeigte sich eine pro-proliferative Wirkung von NFATc1, welche jedoch nicht ausreichte, um im Mausmodell typische Vorstufen für die Karzinogenese oder ein PDAC zu induzieren.

In über 90% der humanen Pankreaskarzinome und bereits in 20% der PanIN1-Läsionen kann darüber hinaus eine Mutation des proliferationsfördernden Onkogens Kras nachgewiesen werden (Hruban et al., 1993; Ottenhof et al., 2011). Die Pankreas-spezifische Expression eines konstitutiv aktiven Kras-Allels (*Kras*^{G12D}) im Mausmodell bewirkt die Entstehung des gesamten PanIN-Spektrums von PanIN1A bis PanIN3 (Hingorani et al., 2003). Insgesamt konnte die humane Pankreaskarzinogenese nach dem Progressionsmodell rekapituliert werden. Allerdings entwickelten lediglich zwei von 29 *Kras*^{G12D}-Mäusen im Beobachtungszeitraum von über einem Jahr ein invasiv wachsendes PDAC (Hingorani et al., 2003). Weitere Studien belegen, dass offensichtlich weitere onkogene Ereignisse notwendig sind, um die Progression zum Pankreaskarzinom zu stimulieren (Collins et al., 2012; Morris et al., 2010).

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die Situation einer simultanen *Kras*^{G12D}- und NFATc1-Aktivierung, wie sie im humanen Pankreaskarzinom häufig vorzufinden ist, imitiert. Das vorgestellte *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D}-Mausmodell rekapitulierte die Karzinogenese des humanen PDAC über die prämaligen PanIN-Vorstufen zuverlässig. Hierbei konnte die Expression von *c.n.NFATc1* in allen Schritten der Karzinogenese nachgewiesen werden. Da *c.n.NFATc1* allein jedoch keine Ausbildung von PanIN-Läsionen auslösen kann, scheint die Initiation der Karzinogenese von *Kras*^{G12D} abhängig zu sein (Collins et al., 2012; Hingorani et al., 2003; Morris et al., 2010). Es konnte daher gezeigt werden, dass *c.n.NFATc1* durch eine Akzeleration der *Kras*^{G12D}-induzierten Karzinogenese die Entwicklung des PDAC begünstigt.

Diese Beschleunigung wurde anhand verschiedener Beobachtungen am *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D}-Mausmodell gegenüber Mäusen, die lediglich *Kras*^{G12D} exprimierten, nachgewiesen: Die Entstehung und das Wachstum der Tumoren wurde durch Coexpression beider Onkogene beschleunigt, was sich in einer

früheren Manifestation und einer höheren Inzidenz von Tumoren widerspiegelte und mit einem erhöhten Proliferationsindex der Tumoren einherging. Histologisch imponierte ferner ein früheres Auftreten von PanIN-Läsionen und PDAC in *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mauspankreatata gegenüber *Kras^{G12D}*-Mauspankreatata.

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse eine akzelerierende Funktion von NFATc1 in der Kras-induzierten Pankreaskarzinogenese.

4.1.1 *C.n.NFATc1;Kras^{G12D}*- Mäuse entwickeln Tumoren durch azinär-duktale Transdifferenzierung

Nachdem lange Zeit duktale Zellen für die Entstehung von PanIN-Läsionen verantwortlich gemacht wurden, verdichten sich mittlerweile die Hinweise auf azinäre Ursprungszellen. Nach diesem Modell durchlaufen azinäre Zellen eine Reprogrammierung über histologisch sichtbare azinär-duktale Metaplasien hin zu PanIN-Läsionen (Rooman und Real, 2012; Shi et al., 2013). Eine solche Transdifferenzierung wurde bereits in der Pankreaskarzinogenese des *Kras^{G12D}*-Mausmodells beschrieben, während im *c.n.NFATc1*-Mausmodell keine Zunahme duktaler Strukturen und demnach vermutlich keine Transdifferenzierung zu finden war (Zhu et al., 2007). Durch den in dieser Arbeit festgestellten Verlust der azinären Differenzierung bei wahrscheinlich gleichzeitiger Zunahme duktaler Merkmale kann die azinär-duktale Transdifferenzierung auch für Pankreaszellen des *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mausmodells angenommen werden. Zum definitiven Nachweis dieser Hypothese sollten weitere Co-Färbungen der Pankreasgewebe von *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mäusen mit Antikörpern gegen Amylase und CK19 erfolgen.

Besonders der embryonale Notch-Signalweg steht hierbei im Fokus an der Reprogrammierung und damit an der Entstehung der azinär-duktalen Metaplasien mitzuwirken (De La O et al., 2008; De La et al., 2008; Mazur et al., 2010; Shi et al., 2013). Die Bedeutung des onkogenen Notch-Signalweges in der Initiation der Karzinogenese des PDAC kann durch einen Knock-out von Notch2 im *Kras^{G12D}*-Mausmodell, ebenso wie durch medikamentöse Unterbrechung des Notch-Signalweges im Mausmodell unterstrichen werden: Die Bildung von

PanIN-Läsionen wurde hierdurch verhindert und das Gesamtüberleben der Mäuse verlängert (Mazur et al., 2010; Plentz et al., 2009). Andererseits konnte gezeigt werden, dass *Kras*^{G12D} im Mausmodell azinär-duktales Metaplasien und PanIN-Läsionen trotz Knock-out von Notch1 induziert (Avila et al., 2012). Daher scheint eine differenziertere Betrachtung des Notch-Signalweges notwendig zu sein, um diese scheinbaren Widersprüche aufzuklären.

Eine erhöhte Expression des Notch-Zielgens Hes1, welches als zuverlässiger Surrogatparameter der Notch-Aktivität gilt, wurde in PanIN-Läsionen von *Kras*^{G12D}-Mäusen und im humanen PDAC nachgewiesen (Hingorani et al., 2003; Miyamoto et al., 2003; Plentz et al., 2009). Analog hierzu war der Notch-Signalweg auch in Pankreata von *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D}-Mäusen aktiviert. *C.n.NFATc1* bewirkte jedoch zusätzlich zum *Kras*^{G12D}-Einfluss eine insgesamt deutlich erhöhte Expression von Hes1 in Pankreata transgener *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D}-Mäuse, sodass eine direkte oder indirekte Stimulation des Notch-Signalweges durch *c.n.NFATc1* postuliert werden kann.

Einen weiteren Hinweis für die Beeinflussung der azinär-duktales Transdifferenzierung durch *c.n.NFATc1* lieferte die Beobachtung, dass *c.n.NFATc1* bereits in Azinuszellen, ebenso wie in Zellen der azinär-duktales Metaplasie, exprimiert wurde.

4.1.2 Coexpression von *c.n.NFATc1* und *Kras*^{G12D} resultiert in einer gesteigerten Malignität

Ein weiteres charakteristisches Merkmal des humanen PDAC ist seine hohe Malignität. Diese drückt sich durch eine sehr schlechte Prognose aus. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt nur 5-7 % für Männer und 3-8 % für Frauen in Deutschland (Husmann et al., 2010). Passend dazu wiesen *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D}-Mäuse verglichen mit ihren Kontrollgruppen eine dramatisch verkürzte Überlebensdauer auf. Außerdem imponierte ein leicht verkürztes Überleben der *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D};*P48-Cre*-Mäuse gegenüber den *c.n.NFATc1;Kras*^{G12D};*PDX1-Cre*-Mäusen. Die Cre-Rekombinase, welche für die

Expression der Genkonstrukte notwendig war, wurde entweder dem Pankreas-spezifischen Promotor P48 oder PDX1 nachgeschaltet. Für eine P48-abhängige Expression der Cre-Rekombinase konnte in vorherigen Studien eine uniforme Expression im gesamten Pankreas aufgezeigt werden, während die PDX1-abhängige Cre-Rekombinase-Expression zufällig auf die Pankreaszellen verteilt auftrat. Somit wurde unter dem PDX1-Promotor im gesamten Pankreas weniger Cre-Rekombinase als unter dem P48-Promotor exprimiert (Hingorani et al., 2003). Durch eine konsekutiv höhere Expression von *c.n.NFATc1* und *Kras^{G12D}* in Pankreata der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre*-Mäuse erklärte sich vermutlich deren kürzere Überlebensdauer. Abgesehen von der Überlebensdauer, verlief die Entwicklung der *P48-Cre*-abhängigen und *PDX1-Cre*-abhängigen Mäuse jedoch insgesamt bei allen untersuchten Charakteristika stark vergleichbar.

Der Grund für die schlechte Prognose fand sich sowohl beim Menschen als auch im *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mausmodell unter anderem im invasiven Wachstumsverhalten der Tumoren und in deren Tendenz, frühzeitig zu metastasieren (Fernandez-del Castillo, 01/2011). Analog dazu wurden die murinen PDAC als überwiegend mäßig bis schlecht differenziert eingestuft – dies korreliert mit den häufigsten Einstufungen im humanen PDAC und geht dabei mit einer schlechten Prognose einher (Longnecker, 2011). Weiterhin bewirkte der Einfluss von *c.n.NFATc1* in Kooperation mit mutiertem *Kras^{G12D}* eine verstärkte Expression des pro-inflammatorischen COX-2 Gens in *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Kohorten. Diese Kriterien werden häufig in humanen PDAC erfüllt und führen unabhängig voneinander zu einer Verschlechterung der Prognose eines Tumors im Menschen (Matsubayashi et al., 2007; Scholzen und Gerdes, 2000).

4.2 Die Rolle von NFATc1 bei der Überwindung der Kras-induzierten Seneszenz

Während *Kras^{G12D}* die Initiation der Karzinogenese bewirkt und für diese notwendig erscheint, findet eine Progression zum PDAC nur in wenigen Fällen statt (Collins et al., 2012; Hingorani et al., 2003; Morris et al., 2010). Nur ein Bruchteil aller Zellen, die mutiertes *Kras* exprimieren, entwickelt prämaligne

Vorläuferläsionen oder gar ein PDAC im *Kras*^{G12D}-Mausmodell (De La O et al., 2008).

Studien deuten darauf hin, dass die weitere Progression zum PDAC im *Kras*^{G12D}-Mausmodell durch einen gegenläufig induzierten Zellzyklusarrest, die sogenannte Seneszenz, gestoppt wird (Collado und Serrano, 2006). Als Seneszenz wird ein irreversibler Wachstumsarrest von Zellen bezeichnet, welcher durch den Einfluss verschiedenster Stressoren zu Stande kommt. Hierbei scheinen Onkogene wie z.B. *Kras*^{G12D} durch die sogenannte Onkogen-induzierte Seneszenz als Stressoren eine entscheidende Rolle zu spielen (Collado und Serrano, 2010). Diese induzieren vermutlich zelluläre Abwehrmechanismen wie z.B. eine Erhöhung der p16^{INK4A}- oder p53-Expression, um die weitere Progression zu blockieren (Collado und Serrano, 2006). Auf diese Weise stellt die Seneszenz einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen die Entwicklung eines Malignoms dar. Zum weiteren Progress der Karzinogenese scheinen folglich neben einer *Kras*-Mutation weitere onkogene Stimuli notwendig zu sein, welche die Onkogen-induzierte Seneszenz überwinden (Collins et al., 2012; Morris et al., 2010).

Die Induktion der Expression des Zellzyklusinhibitors p16^{INK4A} ist einer der Hauptmechanismen der Seneszenz (Collado und Serrano, 2006). Wie Western Blot und immunhistochemische Studien am *Kras*^{G12D}-Mausmodell zeigten, kommt es zu einem Anstieg der Expression von p16^{INK4A} und damit vermutlich zur Onkogen-induzierten Seneszenz in PanIN-Zellen, was somit als Ursache für die fehlende Progression zum Pankreaskarzinom diskutiert wird. Im humanen Pankreaskarzinom konnten dagegen in 80-95% der sporadischen Fälle eine Inaktivierung von p16^{INK4A} nachgewiesen werden, welche durch Mutationen der Genregion oder Hypermethylierungen der entsprechenden Promotorregion bedingt sein kann (Kusy et al., 2004; Schutte et al., 1997). Passend dazu berichteten Guerra et al. (2011), dass durch Inaktivierung des Tumorsuppressors p16^{INK4A} im *Kras*^{G12D}-Mausmodell Pankreaskarzinome entstanden, indem die *Kras*-induzierte Seneszenz überwunden wurde. Die vorliegende Arbeit liefert analog dazu Hinweise auf eine NFATc1-vermittelte Repression von p16^{INK4A}.

Allerdings ist noch unklar, ob NFATc1 direkt die p16^{INK4A} Expression reguliert, was durch Knock-out Experimente nachgewiesen werden könnte. Weiterhin ist nicht bekannt, ob der beobachtete Expressionsverlust auf epigenetischer oder transkriptioneller Ebene stattfindet. Im Einklang dazu konnte kürzlich gezeigt werden, dass NFATc2 als Repressor von p15^{INK4b} fungiert, einem weiteren Induktor von Seneszenz. Es erscheint daher denkbar, dass NFAT Proteine u.a. durch Hemmung wichtiger Zellzyklusinhibitoren und Seneszenz-Induktoren zur Kras getriggerten Karzinogenese beitragen (Baumgart et al., 2012).

4.3 NFAT -Inhibitoren in der Therapie des PDAC

Die entscheidende Relevanz von NFATc1 in der Karzinogenese des PDAC, die durch die vorliegende Arbeit bekräftigt werden konnte, lässt NFATc1 und dessen Signalweg in den Fokus neuer Therapieansätze rücken. Bekannte Inhibitoren des NFAT-Signalweges sind die beiden Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A (CsA) und FK506 (Tacrolimus). Beide Substanzen interagieren mit gebundenen endogenen Proteinen mit Calcineurin und verhindern auf diese Weise die Dephosphorylierung von Proteinsubstraten, zu welchen auch NFATc1 gehört, sodass NFATc1 nicht in den Zellkern gelangen und aktiviert werden kann. Beide Medikamente werden als Immunsuppressiva klinisch verbreitet eingesetzt um Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantaten zu verhindern sowie bei aggressiven Formen der rheumatoiden Arthritis und Psoriasis (Medyouf und Ghysdael, 2008). Der Einsatz in der Onkologie scheint jedoch durch die schwerwiegenden Nebenwirkungen wie z.B. Neurotoxizität, Nephrotoxizität, gastrointestinale Störungen und die Hypertension limitiert zu sein. Besonders die Langzeitnebenwirkung neu auftretender Karzinome nach mehr als zehnjähriger Medikation schränken die Nutzung von CsA und FK506 in der Onkologie stark ein (Medyouf und Ghysdael, 2008). Daher ist die Entwicklung NFAT-spezifischer Medikamente erforderlich, um die Rate an Nebenwirkungen zu verringern. Ein eventuell Erfolg-versprechender Ansatz besteht in der Entwicklung spezieller Peptide, welche die Bindung von Calcineurin an NFAT verhindern und somit andere Calcineurin-Bindungspartner nicht beeinflussen (Yu et al., 2007). Vor

allem Inhibitoren, die spezifisch den NFAT-Signalweg in Tumorzellen unter Umgehung des Immunsystems hemmen, sind von größtem Interesse. Hierbei wird die Blockade endogener NFAT-Aktivatoren als Therapieansatz diskutiert. So führt die Inhibition der Glykogen Synthase Kinase (GSK)-3 zu einer Verringerung der NFAT-Transkriptionsaktivität und des Zellwachstums im Xenograft-Mausmodell des PDAC (Baumgart et al., 2013; Singh et al., 2011).

4.4 Schlussfolgerung

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFATc1 für die Karzinogenese des duktales Adenokarzinoms des Pankreas konnte durch die Daten dieser Arbeit zum ersten Mal *in vivo* bestätigt werden. NFATc1 fungiert hierbei als Akzelerator der Kras-abhängigen Karzinogenese.

Die Initiation der Karzinogenese geht nach diesem Modell von einer Kras-Mutation aus, die jedoch durch zelleigene Abwehrmechanismen, wie z.B. der Einleitung eines permanenten Wachstumsarrestes, der Seneszenz, gestoppt wird. Kommt es jedoch zusätzlich zu einer erhöhten Expression und Aktivierung von NFATc1, beispielsweise im Rahmen einer chronischen Pankreatitis, so kann dieser Wachstumsarrest überwunden werden und die Pankreaskarzinogenese voranschreiten. NFATc1 vermittelt eine Repression des Tumorsuppressors p16^{INK4A} und könnte dadurch die Kras-induzierte Seneszenz überwinden. Im Mausmodell verstärkt und akzeleriert NFATc1 die Kras-induzierte Proliferation und die Reprogrammierung von Azinuszellen, wodurch sich diese über azinär-duktales Metaplasien und pankreatische intraepitheliale Läsionen zu hochmalignen Pankreaskarzinomen entwickeln.

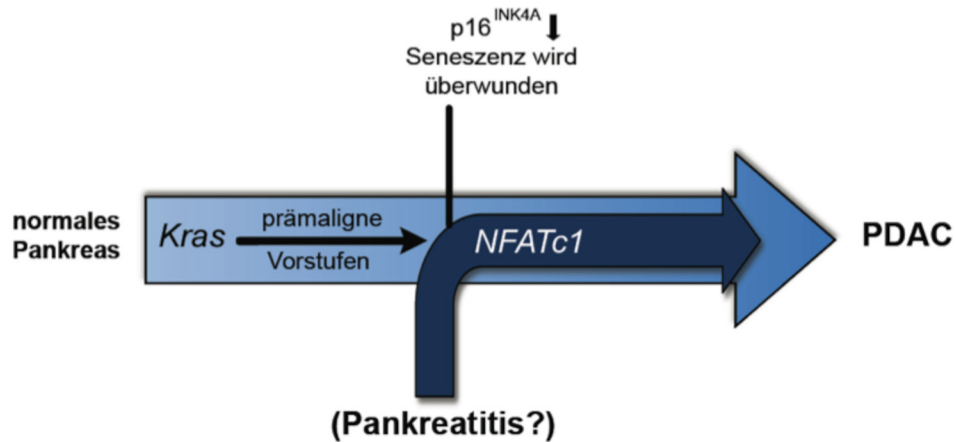


Abbildung 28: Hypothetischer Ablauf der NFATc1-bedingten Akzeleration der Kras-abhängigen Pankreaskarzinogenese.

Eine aktivierende Kras-Mutation bewirkt im Pankreas die Entstehung prämaligner Vorstufen, die Entstehung eines PDAC wird jedoch durch die Kras-induzierte Seneszenz verhindert. Erst die Kooperation mit überexprimiertem NFATc1, eventuell bedingt durch eine chronische Pankreatitis, führt unter anderem durch p16^{INK4A}-Suppression zur Überwindung der Seneszenz und damit zur Entstehung eines PDAC.

Insgesamt zeigte sich i. R. dieser Arbeit, dass die Genese des Pankreaskarzinoms im *c.n.NFATc1;Kras^{G12D}*-Mausmodell exzellent die humane Karzinogenese rekapituliert. Damit ist dieses Mausmodell nicht nur als Tumormodell für weitere Forschungszwecke geeignet, sondern auch als *in vivo* Modell für neue Therapieansätze. Die gezielte medikamentöse Inaktivierung von NFATc1 oder des nachgeschalteten Signalweges in der Behandlung des PDAC scheint daher insgesamt eine potenziell erfolgversprechende Therapieoption darzustellen.

5 Literaturverzeichnis

- Andea, A., F. Sarkar, and V. N. Adsay, 2003, Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma: *Mod Pathol*, v. 16, p. 996-1006.
- Avila, J. L., S. Troutman, A. Durham, and J. L. Kissil, 2012, Notch1 is not required for acinar-to-ductal metaplasia in a model of Kras-induced pancreatic ductal adenocarcinoma: *PLoS One*, v. 7, p. e52133.
- Bardeesy, N., A. J. Aguirre, G. C. Chu, K. H. Cheng, L. V. Lopez, A. F. Hezel, B. Feng, C. Brennan, R. Weissleder, U. Mahmood, D. Hanahan, M. S. Redston, L. Chin, and R. A. Depinho, 2006a, Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse, *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103: United States, p. 5947-52.
- Bardeesy, N., K. H. Cheng, J. H. Berger, G. C. Chu, J. Pahler, P. Olson, A. F. Hezel, J. Horner, G. Y. Lauwers, D. Hanahan, and R. A. DePinho, 2006b, Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer: *Genes Dev*, v. 20, p. 3130-46.
- Baumgart, S., N. M. Chen, J. T. Siveke, A. Konig, J. S. Zhang, S. K. Singh, E. Wolf, M. Bartkuhn, I. Esposito, E. Hessmann, J. Reinecke, J. Nikorowitsch, M. Brunner, G. Singh, M. E. Fernandez-Zapico, T. Smyrk, W. R. Bamlet, M. Eilers, A. Neesse, T. M. Gress, D. D. Billadeau, D. Tuveson, R. Urrutia, and V. Ellenrieder, 2014, Inflammation-Induced NFATc1-STAT3 Transcription Complex Promotes Pancreatic Cancer Initiation by KrasG12D: *Cancer Discov*, v. 4, p. 688-701.
- Baumgart, S., V. Ellenrieder, and M. E. Fernandez-Zapico, 2013, Oncogenic transcription factors: cornerstones of inflammation-linked pancreatic: *Gut*.

- Baumgart, S., E. Glesel, G. Singh, N. M. Chen, K. Reutlinger, J. Zhang, D. D. Billadeau, M. E. Fernandez-Zapico, T. M. Gress, S. K. Singh, and V. Ellenrieder, 2012, Restricted heterochromatin formation links NFATc2 repressor activity with growth promotion in pancreatic cancer: *Gastroenterology*, v. 142, p. 388-98.e1-7.
- Beals, C. R., N. A. Clipstone, S. N. Ho, and G. R. Crabtree, 1997a, Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction: *Genes Dev*, v. 11, p. 824-34.
- Beals, C. R., C. M. Sheridan, C. W. Turck, P. Gardner, and G. R. Crabtree, 1997b, Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3: *Science*, v. 275, p. 1930-4.
- Bohmig, M., and S. Rosewicz, 2004, Pancreatic carcinoma: *Z Gastroenterol*, v. 42, p. 261-8.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54.
- Brune, K., T. Abe, M. Canto, L. O'Malley, A. P. Klein, A. Maitra, N. Volkan Adsay, E. K. Fishman, J. L. Cameron, C. J. Yeo, S. E. Kern, M. Goggins, and R. H. Hruban, 2006, Multifocal neoplastic precursor lesions associated with lobular atrophy of the pancreas in patients having a strong family history of pancreatic cancer: *Am J Surg Pathol*, v. 30, p. 1067-76.
- Buchholz, M., A. Schatz, M. Wagner, P. Michl, T. Linhart, G. Adler, T. M. Gress, and V. Ellenrieder, 2006, Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway: *EMBO J*, v. 25, p. 3714-24.
- Campbell, P. M., A. L. Groehler, K. M. Lee, M. M. Ouellette, V. Khazak, and C. J. Der, 2007, K-Ras promotes growth transformation and invasion of immortalized human pancreatic cells by Raf and phosphatidylinositol 3-kinase signaling: *Cancer Res*, v. 67, p. 2098-106.
- Carriere, C., A. J. Gore, A. M. Norris, J. R. Gunn, A. L. Young, D. S. Longnecker, and M. Korc, 2011, Deletion of Rb accelerates pancreatic carcinogenesis

- by oncogenic Kras and impairs senescence in premalignant lesions: *Gastroenterology*, v. 141, p. 1091-101.
- Collado, M., and M. Serrano, 2006, The power and the promise of oncogene-induced senescence markers: *Nat Rev Cancer*, v. 6, p. 472-6.
- Collado, M., and M. Serrano, 2010, Senescence in tumours: evidence from mice and humans: *Nat Rev Cancer*, v. 10, p. 51-7.
- Collins, M. A., J. C. Brisset, Y. Zhang, F. Bednar, J. Pierre, K. A. Heist, C. J. Galban, S. Galban, and M. P. di Magliano, 2012, Metastatic pancreatic cancer is dependent on oncogenic kras in mice: *PLoS One*, v. 7, p. e49707.
- De La O, J., L. L. Emerson, J. L. Goodman, S. C. Froebe, B. E. Illum, A. B. Curtis, and L. C. Murtaugh, 2008, Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, p. 18907-12.
- De La, O. J., L. L. Emerson, J. L. Goodman, S. C. Froebe, B. E. Illum, A. B. Curtis, and L. C. Murtaugh, 2008, Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, p. 18907-12.
- de Wilde, R., R. Hruban, A. Maitra, and G. Offerhaus, 2012, Reporting precursors to invasive pancreatic cancer: pancreatic intraepithelial neoplasia, intraductal neoplasms and mucinous cystic neoplasm, v. 18, p. 17–30.
- Detlefsen, S., B. Sipos, B. Feyerabend, and G. Kloppel, 2005, Pancreatic fibrosis associated with age and ductal papillary hyperplasia: *Virchows Arch*, v. 447, p. 800-5.
- Dite, P., M. Hermanova, J. Trna, I. Novotny, M. Ruzicka, M. Liberda, and A. Bartkova, 2012, The role of chronic inflammation: chronic pancreatitis as a risk factor of pancreatic cancer: *Dig Dis*, v. 30, p. 277-83.
- Fernandez-del Castillo, C., 01/2011, Clinical manifestations, diagnosis, and surgical staging of exocrine pancreatic cancer, Waltham, MA, UpToDate.
- Fernandez-del Castillo, C., 2011, Clinical manifestations, diagnosis, and surgical staging of exocrine pancreatic cancer, Waltham, MA, UpToDate.

- Gerdes, J., H. Lemke, H. Baisch, H. H. Wacker, U. Schwab, and H. Stein, 1984, Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67: *J Immunol*, v. 133, p. 1710-5.
- Goldstein D, El-Maraghi RH, Hammel P, Heinemann V, Kunzmann V, Sastre J, Scheithauer W, Siena S, Tabernero J, Teixeira L, Tortora G, Van Laethem JL, Young R, Penenberg DN, Lu B, Romano A, Von Hoff DD., 2015, nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial: *J Natl Cancer Inst.* v. 2, p. dju413.
- Gu, G., J. Dubauskaite, and D. A. Melton, 2002, Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and: *Development*, v. 129, p. 2447-57.
- Guerra, C., M. Collado, C. Navas, A. J. Schuhmacher, I. Hernandez-Porras, M. Canamero, M. Rodriguez-Justo, M. Serrano, and M. Barbacid, 2011, Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene induced senescence: *Cancer Cell*, v. 19, p. 728-39.
- Guerra, C., N. Mijimolle, A. Dhawahir, P. Dubus, M. Barradas, M. Serrano, V. Campuzano, and M. Barbacid, 2003, Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context: *Cancer Cell*, v. 4, p. 111-20.
- Guerra, C., A. J. Schuhmacher, M. Cañamero, P. J. Grippo, L. Verdaguer, L. Pérez-Gallego, P. Dubus, E. P. Sandgren, and M. Barbacid, 2007, Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice.: *Cancer Cell*, v. 11, p. 291-302.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg, 2011, Hallmarks of cancer: the next generation: *Cell*, v. 144, p. 646-74.
- Haugk, B., 2010, Pancreatic intraepithelial neoplasia-can we detect early pancreatic cancer?: *Histopathology*, v. 57, p. 503-14.
- Herdegen, T., 2008, Zytostatika, Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie: Stuttgart, Thieme Verlag, p. 338-340.
- Hingorani, S. R., E. F. Petricoin, A. Maitra, V. Rajapakse, C. King, M. A. Jacobetz, S. Ross, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, B. A. Hitt, Y.

- Kawaguchi, D. Johann, L. A. Liotta, H. C. Crawford, M. E. Putt, T. Jacks, C. V. Wright, R. H. Hruban, A. M. Lowy, and D. A. Tuveson, 2003, Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse: *Cancer Cell*, v. 4, p. 437-50.
- Hingorani, S. R., L. Wang, A. S. Multani, C. Combs, T. B. Deramaudt, R. H. Hruban, A. K. Rustgi, S. Chang, and D. A. Tuveson, 2005, Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice.: *Cancer Cell*, v. 7, p. 469-83.
- Hruban, R. H., and N. Fukushima, 2007, Pancreatic adenocarcinoma: update on the surgical pathology of carcinomas of ductal origin and PanINs: *Mod Pathol*, v. 20 Suppl 1, p. S61-70.
- Hruban, R. H., M. Goggins, J. Parsons, and S. E. Kern, 2000, Progression model for pancreatic cancer: *Clin Cancer Res*, v. 6, p. 2969-72.
- Hruban, R. H., A. Maitra, R. Schulick, D. Laheru, J. Herman, S. E. Kern, and M. Goggins, 2008, Emerging molecular biology of pancreatic cancer: *Gastrointest Cancer Res*, v. 2, p. S10-5.
- Hruban, R. H., K. Takaori, D. S. Klimstra, N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, A. V. Biankin, S. A. Biankin, C. Compton, N. Fukushima, T. Furukawa, M. Goggins, Y. Kato, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges, A. Maitra, G. J. Offerhaus, M. Shimizu, and S. Yonezawa, 2004, An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms: *Am J Surg Pathol*, v. 28, p. 977-87.
- Hruban, R. H., A. D. van Mansfeld, G. J. Offerhaus, D. H. van Weering, D. C. Allison, S. N. Goodman, T. W. Kensler, K. K. Bose, J. L. Cameron, and J. L. Bos, 1993, K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization: *Am J Pathol*, v. 143, p. 545-54.

- Husmann, G., P. Kaatsch, A. Katalinic, J. Bertz, J. Haberland, K. Kraywinkel, and U. Wolf, 2010, Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends, Humboldt University Berlin, Germany.
- Ijichi, H., A. Chytil, A. E. Gorska, M. E. Aakre, Y. Fujitani, S. Fujitani, C. V. Wright, and H. L. Moses, 2006, Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression: *Genes Dev*, v. 20, p. 3147-60.
- Jackson, E. L., N. Willis, K. Mercer, R. T. Bronson, D. Crowley, R. Montoya, T. Jacks, and D. A. Tuveson, 2001, Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of: *Genes Dev*, v. 15, p. 3243-8.
- Koenig, A., T. Linhart, K. Schlengemann, K. Reutlinger, J. Wegele, G. Adler, G. Singh, L. Hofmann, S. Kunsch, T. Buch, E. Schafer, T. M. Gress, M. E. Fernandez-Zapico, and V. Ellenrieder, 2010, NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells, *Gastroenterology*, v. 138: United States, 2010 AGA Institute. Published by Elsevier Inc, p. 1189-99 e1-2.
- Koorstra, J. B., S. R. Hustinx, G. J. Offerhaus, and A. Maitra, 2008, Pancreatic carcinogenesis: *Pancreatology*, v. 8, p. 110-25.
- Kusy, S., C. J. Larsen, and J. Roche, 2004, p14ARF, p15INK4b and p16INK4a methylation status in chronic myelogenous leukemia: *Leuk Lymphoma*, v. 45, p. 1989-94.
- König, A., M. E. Fernandez-Zapico, and V. Ellenrieder, 2010, Primers on molecular pathways--the NFAT transcription pathway in pancreatic cancer.: *Pancreatology*, v. 10, p. 416-22.
- Kranenburg, O., 2005, The KRAS oncogene: past, present, and future: *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1756 (2), p. 81-2.
- Lee, M. J., H. S. Lee, W. H. Kim, Y. Choi, and M. Yang, 2003, Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system: *Mod Pathol*, v. 16, p. 403-10.

- Longnecker, D. S., 2011, Pathology of exocrine pancreatic neoplasms, *in* D. S. Basow, ed., UpToDate: Waltham, MA, USA.
- Lowenfels, A. B., P. Maisonneuve, G. Cavallini, R. W. Ammann, P. G. Lankisch, J. R. Andersen, E. P. Dimagno, A. Andren-Sandberg, and L. Domellof, 1993, Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study: *N Engl J Med*, v. 328, p. 1433-7.
- Maitra, A., R. Ashfaq, C. R. Gunn, A. Rahman, C. J. Yeo, T. A. Sohn, J. L. Cameron, R. H. Hruban, and R. E. Wilentz, 2002, Cyclooxygenase 2 expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasia: *Am J Clin Pathol*, v. 118, p. 194-201.
- Malka, D., P. Hammel, F. Maire, P. Rufat, I. Madeira, F. Pessione, P. Levy, and P. Ruszniewski, 2002, Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis: *Gut*, v. 51, p. 849-52.
- Mancini, M., and A. Toker, 2009, NFAT proteins: emerging roles in cancer progression, *Nat Rev Cancer*, v. 9: England, p. 810-20.
- Matsubayashi, H., J. R. Infante, J. Winter, A. P. Klein, R. Schulick, R. Hruban, K. Visvanathan, and M. Goggins, 2007, Tumor COX-2 expression and prognosis of patients with resectable pancreatic cancer: *Cancer Biol Ther*, v. 6, p. 1569-75.
- Matsuo, Y., P. M. Campbell, R. A. Brekken, B. Sung, M. M. Ouellette, J. B. Fleming, B. B. Aggarwal, C. J. Der, and S. Guha, 2009, K-Ras promotes angiogenesis mediated by immortalized human pancreatic epithelial cells through mitogen-activated protein kinase signaling pathways: *Mol Cancer Res*, v. 7, p. 799-808.
- Mazur, P. K., H. Einwachter, M. Lee, B. Sipos, H. Nakhai, R. Rad, U. Zimmer-Strobl, L. J. Strobl, F. Radtke, G. Kloppel, R. M. Schmid, and J. T. Siveke, 2010, Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, p. 13438-43.

- Medyouf, H., and J. Ghysdael, 2008, The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors: *Cell Cycle*, v. 7, p. 297-303.
- Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, M. S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C. M. van der Horst, D. M. Majoor, J. W. Shay, W. J. Mooi, and D. S. Peeper, 2005, BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi: *Nature*, v. 436, p. 720-4.
- Miyamoto, Y., A. Maitra, B. Ghosh, U. Zechner, P. Argani, C. A. Iacobuzio-Donahue, V. Sriuranpong, T. Iso, I. M. Meszoely, M. S. Wolfe, R. H. Hruban, D. W. Ball, R. M. Schmid, and S. D. Leach, 2003, Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis, *Cancer Cell*, v. 3: United States, p. 565-76.
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., Parulekar, W., 2007, Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group: *Journal of clinical oncology*, v. 15, p. 1960-1966.
- Morris, J. P. t., S. C. Wang, and M. Hebrok, 2010, KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal: *Nat Rev Cancer*, v. 10, p. 683-95.
- Muller, M. R., and A. Rao, 2010, NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age: *Nat Rev Immunol*, v. 10, p. 645-56.
- Mülhardt, C., 2009, *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*, v. 6: Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Nakhai, H., S. Sel, J. Favor, L. Mendoza-Torres, F. Paulsen, G. I. Duncker, and R. M. Schmid, 2007, Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine: *Development*, v. 134, p. 1151-60.
- Ottendorf, N. A., R. F. de Wilde, A. Maitra, R. H. Hruban, and G. J. Offerhaus, 2011, Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma.: *Patholog Res Int*, v. 2011, p. 620601.

- Perez-Mancera, P. A., C. Guerra, M. Barbacid, and D. A. Tuveson, 2012, What we have learned about pancreatic cancer from mouse models: *Gastroenterology*, v. 142, p. 1079-92.
- Plentz, R., J. S. Park, A. D. Rhim, D. Abravanel, A. F. Hezel, S. V. Sharma, S. Gurumurthy, V. Deshpande, C. Kenific, J. Settleman, P. K. Majumder, B. Z. Stanger, and N. Bardeesy, 2009, Inhibition of gamma-secretase activity inhibits tumor progression in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma: *Gastroenterology*, v. 136, p. 1741-9.e6.
- Rachagani, S., S. Senapati, S. Chakraborty, M. P. Ponnusamy, S. Kumar, L. M. Smith, M. Jain, and S. K. Batra, 2011, Activated KrasG(1)(2)D is associated with invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through inhibition of E-cadherin: *Br J Cancer*, v. 104, p. 1038-48.
- Rehm, H., and T. Letzel, 2010, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*: Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Rooman, I., and F. X. Real, 2012, Pancreatic ductal adenocarcinoma and acinar cells: a matter of differentiation and development?: *Gut*, v. 61, p. 449-58.
- Russo, A., S. Rizzo, G. Bronte, N. Silvestris, G. Colucci, N. Gebbia, V. Bazan, and F. Fulfaro, 2009, The long and winding road to useful predictive factors for anti-EGFR therapy in metastatic colorectal carcinoma: the KRAS/BRAF pathway, *Oncology*, v. 77 Suppl 1: Switzerland, 2010 S. Karger AG, Basel., p. 57-68.
- Schlosser, W., S. Schlosser, M. Ramadani, F. Gansauge, S. Gansauge, and H. G. Beger, 2002, Cyclooxygenase-2 is overexpressed in chronic pancreatitis: *Pancreas*, v. 25, p. 26-30.
- Scholzen, T., and J. Gerdes, 2000, The Ki-67 protein: from the known and the unknown: *J Cell Physiol*, v. 182, p. 311-22.
- Schussler, M. H., A. Skoudy, F. Ramaekers, and F. X. Real, 1992, Intermediate filaments as differentiation markers of normal pancreas and pancreas cancer: *Am J Pathol*, v. 140, p. 559-68.

- Schutte, M., R. H. Hruban, J. Geradts, R. Maynard, W. Hilgers, S. K. Rabindran, C. A. Moskaluk, S. A. Hahn, I. Schwarte-Waldhoff, W. Schmiegel, S. B. Baylin, S. E. Kern, and J. G. Herman, 1997, Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic cancer: *Cancer Res*, v. 57, p. 3126-30.
- Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach, and S. W. Lowe, 1997, Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a: *Cell*, v. 88, p. 593-602.
- Seufferlein, T., and G. Adler, 2009, The S3 guideline exocrine pancreatic cancer: *Med Klin (Munich)*, v. 104, p. 869-74.
- Shaw, J. P., P. J. Utz, D. B. Durand, J. J. Toole, E. A. Emmel, and G. R. Crabtree, 1988, Identification of a putative regulator of early T cell activation genes: *Science*, v. 241, p. 202-5.
- Shi, C., S. M. Hong, P. Lim, H. Kamiyama, M. Khan, R. A. Anders, M. Goggins, R. H. Hruban, and J. R. Eshleman, 2009, KRAS2 mutations in human pancreatic acinar-ductal metaplastic lesions are limited to those with PanIN: implications for the human pancreatic cancer cell of origin: *Mol Cancer Res*, v. 7, p. 230-6.
- Shi, G., D. DiRenzo, C. Qu, D. Barney, D. Miley, and S. F. Konieczny, 2013, Maintenance of acinar cell organization is critical to preventing Kras-induced acinar-ductal metaplasia: *Oncogene*, v. 32, p. 1950-8.
- Singh, G., S. K. Singh, A. Konig, K. Reutlinger, M. D. Nye, T. Adhikary, M. Eilers, T. M. Gress, M. E. Fernandez-Zapico, and V. Ellenrieder, 2010, Sequential activation of NFAT and c-Myc transcription factors mediates the TGF-beta switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation, *J Biol Chem*, v. 285: United States, p. 27241-50.
- Singh, S. K., S. Dobes, G. Singh, A. O. Koenig, K. Reutlinger, L. C. Hofbauer, P. Barth, T. M. Gress, G. Lomberg, R. Urrutia, M. E. Fernandez-Zapico, and V. Ellenrieder, 2011, Disruption of a nuclear NFATc2 stabilization loop confers breast and pancreatic cancer growth suppression by zoledronic acid: *J Biol Chem*.

- Sprich, C., 2006, Optimierung von Immunhistochemie-Protokollen an Tissue Microarrays - Erfahrungen mit 70 verschiedenen Antikörpern, Basel.
- Sternberg, N., and D. Hamilton, 1981, Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. Recombination between loxP sites, v. 150, p. 467–486.
- Vaccaro V., Sperduti I., Milella M., FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer 2011: N Engl J Med., v 25, p. 768-9.
- Vincent, A., J. Herman, R. Schulick, R. H. Hruban, and M. Goggins, 2011, Pancreatic cancer: Lancet.
- Yu, H., T. J. van Berkel, and E. A. Biessen, 2007, Therapeutic potential of VIVIT, a selective peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells, in cardiovascular disorders: Cardiovasc Drug Rev, v. 25, p. 175-87.
- Zhu, L., G. Shi, C. M. Schmidt, R. H. Hruban, and S. F. Konieczny, 2007, Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia: Am J Pathol, v. 171, p. 263-73.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PanIN-Läsionen in Gewebeschnitten humaner Pankreata (de Wilde et al., 2012).....	4
Abbildung 2: Initiation und Progression des PDAC (Morris et al., 2010)	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der PDAC-Entwicklung.....	10
Abbildung 4: Primärstruktur der NFAT-Transkriptionsfaktoren in schematischer Darstellung (nach Koenig et al., 2010)	11
Abbildung 5: Ca^{2+} /Calcineurin/NFAT-Signalweg in schematischer Darstellung (modifiziert nach Mancini und Toker, 2009).....	13
Abbildung 6: Cre-vermittelte Aktivierung von <i>c.n.NFATc1</i>	16
Abbildung 7: Proliferierende und apoptotische Pankreaszellen von <i>c.n.NFATc1;P48/PDX1-Cre</i> -Mäusen.....	17
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Genkonstrukts für konstitutiv nukleäres NFATc1	23
Abbildung 9: Cre-vermittelte Aktivierung der inserierten Gene <i>c.n.NFATc1</i> und <i>Kras</i> ^{G12D}	25
Abbildung 10: PCR-Analyse zum Nachweis der Gene <i>P48/PDX1-Cre</i> , <i>c.n.NFATc1</i> und <i>Kras</i> ^{G12D}	46
Abbildung 11: <i>C.n.NFATc1</i> - Expression im Pankreas von <i>c.n.NFATc1;Kras</i> ^{G12D} ; <i>P48-Cre</i> - und <i>c.n.NFATc1;P48-Cre</i> -Mäusen.	47
Abbildung 12: Repräsentative Profildarstellung einer <i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>P48-Cre</i> Maus (A) und einer <i>c.n.NFATc1;Kras</i> ^{G12D} ; <i>P48-Cre</i> Maus (B).	48
Abbildung 13: Eröffneter Bauchsitus und Pankreas einer <i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>P48-Cre</i> Maus und <i>c.n.NFATc1;Kras</i> ^{G12D} ; <i>P48-Cre</i> Maus im Alter von vier Wochen.	49
Abbildung 14: Eröffneter Bauchsitus einer repräsentativen <i>c.n.NFATc1;Kras</i> ^{G12D} ; <i>P48-Cre</i> Maus im Alter von sieben Monaten.	50
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der <i>c.n.NFATc1;Kras</i> ^{G12D} ; <i>PDX1/P48-Cre</i> -Mäuse und der <i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>PDX1/P48-Cre</i> -Kontrollmäuse.....	51

Abbildung 16: Verschiedene Dysplasiestufen in Gewebeschnitten von <i>c.n.NFATc1;Kras^{G12D};PDX1/P48-Cre</i> Mäusen.	53
Abbildung 17: Vergleich von <i>Kras^{G12D};P48-Cre</i> und <i>c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre</i> Mäusen verschiedener Altersstufen.....	54
Abbildung 18: Focus eines duktales Adenokarzinoms (A,B) des Pankreas und einer Lebermetastase (C) einer <i>c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre</i> Maus.	55
Abbildung 19: Inzidenz histologisch gesicherter duktales Adenokarzinome des Pankreas von <i>c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre</i> und der <i>Kras^{G12D};P48-Cre</i> Mäusen in Abhängigkeit vom Alter.	56
Abbildung 20: Proliferation des Pankreasgewebes von <i>c.n.NFATc1;Kras^{G12D}</i> und <i>Kras^{G12D}</i> -Mäusen.	58
Abbildung 21: Grading der <i>c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre</i> Mäuse.	59
Abbildung 22: Expression der Cyclooxygenase-2 in dysplastischen Arealen von <i>Kras^{G12D};P48-Cre</i> und <i>c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre</i> Mäusen.....	60
Abbildung 23: NFATc1-Expression in Gewebe von <i>c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre</i> Mäusen und in humanem Pankreasgewebe.	62
Abbildung 24: Verlust der azinären Differenzierung in <i>c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre</i> Mauspankreatata.	64
Abbildung 25: Immunhistologischer Nachweis der duktales Differenzierung der Dysplasien und des PDAC.	65
Abbildung 26: Aktivität des Notch-Signalweges in <i>Kras^{G12D};P48-Cre</i> und in <i>c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48-Cre</i> Mäusen im Alter von zwei Wochen.	66
Abbildung 27: Expressionsanalyse von p16 ^{INK4A} in Pankreatata von <i>P48-Cre</i> , <i>c.n.NFATc1;P48-Cre</i> , <i>c.n.NFATc1;Kras^{G12D}P48-Cre</i> und <i>Kras^{G12D}-P48-Cre</i> -Mäusen.	68
Abbildung 28: Hypothetischer Ablauf der NFATc1-bedingten Akzeleration der Kras-abhängigen Pankreaskarzinogenese.....	77

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte.....	20
Tabelle 2: Verwendete Materialien	20
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	22
Tabelle 4: Zur DNA-Extraktion eingesetzter Puffer.....	27
Tabelle 5: Für die Genotypisierung verwendete Primer.....	28
Tabelle 6: Zur Genotypisierung verwendete PCR-Reaktionsansätze.....	29
Tabelle 7: Zur Genotypisierung verwendete PCR-Programme	30
Tabelle 8: Für die PCR und das Agarosegel verwendete Puffer und Lösungen .	31
Tabelle 9: Für die Immunhistochemie verwendete Puffer.....	35
Tabelle 10: Für die Immunhistologie verwendete Antikörper.....	36
Tabelle 11: Für die Immunhistologie verwendetes Kit	36
Tabelle 12: Für die Proteinisolierung verwendeter Puffer.....	37
Tabelle 13: Für die Proteinbestimmung verwendete Lösung.....	38
Tabelle 14: Für die Erstellung eines SDS-PAGE verwendete Puffer und Lösungen.....	41
Tabelle 15: Für die Übertragung auf die Nitrocellulosemembran verwendete Puffer	43
Tabelle 16: Für die Western-Blot Analyse eingesetzte Primärantikörper	43
Tabelle 17: Für die Western-Blot Analyse eingesetzte Sekundärantikörper.....	43
Tabelle 18: Für den Western Blot verwendete Puffer	44

6.3 Abkürzungsverzeichnis

Ala	Alanin
BSA	Bovines Serum Albumin
CAM	Calmodulin
CaN	Calcineurin
CK1	Caseinkinase 1
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
c.n.	Konstitutiv nukleär
COX	Cyclooxygenase
COX2	Cyclooxygenase 2
CRAC	<i>„Ca₂₊ release activated channels“</i>
Cre	<i>„Cause of recombination“</i>
CsA	Cyclosporin A
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DYRK	<i>„dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated-kinase“</i>
ECL	<i>„enhanced chemiluminescence“</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor

EGTA	Ethylenglykolbis(aminoethylether)- tetraessigsäure
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>„Guanosine exchange factor“</i>
GSK-3b	Glykogen-Synthase-Kinase-3 beta
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin A
HRP	<i>„horse radish peroxidase“</i>
IPMN	Intraductale papilläre muzinöse Neoplasien
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MEK	MAP-Kinase-Kinase
KCL	Kaliumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₄ P ₂ O ₇	Tetranatriumdiphosphat
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NF-kB	Nukleärer Faktor-kB
NHR	NFAT-homologe Region
P	Phosphoryliert
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie

PCR	Polymerasekettenreaktion
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
Sos	<i>„Son of Sevenless“</i>
SP	Serin-Prolin-Phosphorylierungsmotive
SRR1	Serin-reiche Region 1
STAT3	<i>„signal transducer and activator of transcription 3“</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBST	<i>„tris-buffered Saline Tween®20“</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β	<i>„transforming growth factor β“</i>
TonEBP	<i>„tonicity enhancer binding protein“</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Triton X-100	Alkylphenylpolyethylenglykol
Tween®20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

6.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Adamkiewicz, Aumüller, Bals, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Berger, Bien, Bolm, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Dodel, Donner-Banzhoff, Eberhart, Eggert, Eilers, Ellenrieder, Engenhardt-Cabilic, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Geldner, Glorius, Görg C., Gress, Grimm, Grundmann, Grzeschik, Hadji, Hamer, Hermann-Lingen, Hertl, Höffken, Hofmann, Höglinger, Hoyer, Jerrentrup, Kann, Kill, Kim-Berger, Kircher, Klenk, Klose, Knake, Knipper, Koch, Konrad, Köhler, Kolb-Niemann, Koolman, Krieg, Krüger, Leonhardt, Leube, Lill, Liss, Loew von, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Meissner, Mandrek, Michl, Mittag, Moll, Moosdorf, Mooy de, Mueller, Müller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimphius, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Petz, Plant, Ramaswamy, Rausch, Renz, Rey del, Richter, Roelcke, Röhm, Roeßler, Rolfes, Röper, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Sahmland, Schade, Schmidt, Schoner, Schu, Schwarz, Seitz, Sekundo, Stauth, Steiniger, Steinkamp, Stiller, Strempel, Strick, Suske, Tackenberg, Teymoortasch, Vassiliou, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann, Wilhelm, Wulf, Wündisch, Yu, Zemlin, Zettl, Zovko.

6.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Volker Ellenrieder, zunächst einmal für den spannenden Themenvorschlag. Er verstand es, während der gesamten Zeit durch seine ungebremste Begeisterung meine Motivation für das Thema dieser Arbeit stets zu erneuern. Durch gemeinsame Diskussionen ließen sich die vielen Puzzlesteine der täglichen Laborarbeit zu einem gemeinsamen Bild zusammenfügen und gezielt neue Fragestellungen aufdecken. Nicht zuletzt ermöglichte die von ihm maßgeblich geprägte, außerordentlich positive Atmosphäre sowohl während der Arbeit als auch über die Laborgrenzen hinweg eine produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Gress, dass ich meine Arbeit in der Abteilung Gastroenterologie anfertigen durfte.

Insbesondere möchte ich mich auch bei Dr. Sandra Baumgart und Kristina Reutlinger bedanken, die in vielen Bereichen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dr. Sandra Baumgart danke ich für die gute Betreuung und insbesondere die äußerst geduldige, zuverlässige und nette Art der Korrektur, die trotz aller Umstände sehr konstruktiv von ihr gemeistert wurde.

Kristina Reutlinger gilt mein Dank für die Einführung sowohl in die Techniken der Laborarbeit als auch für ihr Organisationstalent. Mit ihrer freundlichen und klugen Art waren scheinbar unlösbare Probleme meist doch zu lösen. Auch Dr. Shiv Singh gebührt mein Dank für seine humorvolle, ansteckende Art sowie zielführende Diskussionen.

Bei Dr. Elisabeth Heßmann, Dr. Nai-Ming Chen und Bettina Geisel möchte ich mich für produktive Ratschläge und tatkräftige Unterstützung in vielen Belangen herzlich bedanken.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei meinen Mitdoktoranden, insbesondere Daniel Fink für die gegenseitige Erheiterung und Erleichterung der Arbeit sowie bei Caroline Klindt, Martin Breuer, Johanna Reinecke und Sarah Kernig bedanken. Vielen Dank für die gemeinsam erlebten Stunden. Darüberhinaus danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Buchholz und Michl für die gute Zusammenarbeit.

Für die histopathologische Expertise, u.a. bei Diagnosestellung und Grading der Gewebeschnitte, bedanke ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Irene Esposito, Institut für Pathologie der Technischen Universität München.

Bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern, bedanke ich mich für die liebevolle Unterstützung während meines gesamten Studiums und während meiner Zeit als Doktorand.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Hanna Schäfer, die mir immer die nötige Stärke und den bedingungslosen Rückhalt für alle Herausforderungen des Lebens und insbesondere dieser Arbeit vermittelte.